

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
 United States Patent and Trademark  
 Office  
 Box PCT  
 Washington, D.C.20231  
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)

31 March 2000 (31.03.00)

International application No.

PCT/EP99/05867

Applicant's or agent's file reference

14720/PCT Ri

International filing date (day/month/year)

12 August 1999 (12.08.99)

Priority date (day/month/year)

14 August 1998 (14.08.98)

Applicant

ZIMMERMANN, Ulrich et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

23 February 2000 (23.02.00)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO  
 34, chemin des Colombettes  
 1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

F. Baechler

Telephone No.: (41-22) 338.83.38



09/262850  
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

TECH CENTER 1600/2908

NOV 09 2001

RECEIVED

Applicant's or agent's file reference 14720/PCT Ri	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP99/05867	International filing date (day/month/year) 12 August 1999 (12.08.99)	Priority date (day/month/year) 14 August 1998 (14.08.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C08B 37/04		
Applicant ZIMMERMANN, Ulrich		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 6 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 23 February 2000 (23.02.00)	Date of completion of this report 28 November 2000 (28.11.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/05867

## 1. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-3, 5-29, as originally filed,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
pages 4, 4a, filed with the letter of 09 August 2000 (09.08.2000),  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the claims, Nos. \_\_\_\_\_, as originally filed,  
Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
Nos. 1-27, filed with the letter of 09 August 2000 (09.08.2000),  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/2-2/2, as originally filed,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

## 2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

## 4. Additional observations, if necessary:



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/EP 99/05867**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-14	YES
	Claims	15-27	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-27	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-27	YES
	Claims		NO

**2. Citations and explanations**

1). Reference is made to the following documents:

D1: WO-A-93/24077

D2: Biomaterials, 18 (1997), pages 707-713

D3: WO-A-93/16111

D4: US-A-5 459 054

D5: US-A-5 622 718.

Documents D4 and D5 were not listed in the international search report.

2). Novelty (PCT Article 33(2)):

D2 discloses a method for producing a non-mitogenic substance which, following long contact with a living organism, does not display any immunological reactions and concerns a mixed polymer consisting of guluronic and mannuronic acid, the molar composition of the mannuronic acid radical comprising 70% and having a molecular weight of 10 to 50 kD. In an aqueous solution with a 0.1% concentration, the composition has a viscosity of 4.7 mPa.s (see page 710, Table 1). The alginates are biocompatible and can be used in transplant surgery.





The present application does not meet the requirements of PCT Article 33(2), since the subject matter of Claims 15-27 is not novel.

D3 discloses a non-mitogenic substance that has mixed polymers comprising 10 to 90 mol percent guluronic acid and a remaining percentage up to 100% of mannuronic acid, said polymers having a molecular weight of 10 to 500 kD.

Reference is made in D3 to transplant surgery in which non-mitogenic substances can be used for the encapsulation and implantation of living cells without inducing immunological reactions by the human body. The enclosure of insulin-generating cells (islets) in capsules of non-mitogenic substances is given as a particularly important example. The present application does not meet the requirements of PCT Article 33(2), since the subject matter of Claims 15-27 is not novel.

D4 discloses a purified alginate with a high guluronic acid content comprising, for example, laminaria or lessonia as starting products (see D5: page 6, lines 20-40, which refers to a molecular weight of 797 kD). The alginates are free from compounds that are similar to phenol and from endotoxins. The alginate composition is used to produce alginate capsules for transplant surgery.

The present application does not meet the requirements of PCT Article 33(2), since the subject matter of Claims 15-27 is not novel.



## 3) Inventive step (PCT Article 33(3)):

Document D1, which is regarded as the closest prior art, discloses a method from which the subject matter of Claim 1 differs in that, following collection and dewatering of the precipitated alginate, the steps are repeated at least once more.

The present invention can therefore be considered to address the problem of developing a new method for obtaining ultra-pure alginates.

The solution proposed in Claim 1 of the present application cannot be considered inventive for the following reasons (PCT Article 33(3)):

D1 discloses a method in which an alginate solution is treated with a complexing agent and is subjected to a precipitation reaction using ethanol. Activated carbon is added during extraction of the solution.

A repetition of the steps would clearly lead to a purer product.

D4 discloses a purified alginate with a high guluronic acid content comprising, for example, laminaria or lessonia as starting products (see D5: page 6, lines 20-40, which refers to a molecular weight of 797 kD). The alginates are free from compounds that are similar to phenol and from endotoxins. The alginate composition is used to produce alginate capsules for transplant surgery.

The present application does not meet the



**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

PCT/EP 99/05867

requirements of PCT Article 33(3), since the subject matter of the claims does not involve an inventive step in view of the combined technical teaching of D4 and D1.



**VIII. Certain observations on the international application**

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

Page 5 of the description shows that the following features are essential to the definition of the invention:

- (1) the production process uses clean, fresh algae material or dried algae material.
- (2) the algae material is treated in the presence of complexing agents, from which cellular constituents and particles are sedimented using a binding agent in the form of a granulate or a porous material.

Since independent Claim 1 does not contain these features, it does not meet the requirements of PCT Article 6 in combination with PCT Rule 6.3(b), according to which each independent claim must contain all the technical features that are essential to the definition of the invention.





PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> : <b>C08B 37/04</b>	<b>A1</b>	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 00/09566</b> (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 24. Februar 2000 (24.02.00)
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/05867</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 12. August 1999 (12.08.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 36 960.3 14. August 1998 (14.08.98) DE</p> <p>(71)(72) Anmelder und Erfinder: ZIMMERMANN, Ulrich [DE/DE]; Pfarrer-Fröhlich-Strasse 17, D-97295 Wald- brunn (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BEHRINGER, Marcus [DE/DE]; Ludwig-Seufert-Strasse 431, D-97299 Zell/Main (DE).</p> <p>(74) Anwalt: HERTZ, Oliver; V. Bezold &amp; Sozien, Akademiestrasse 7, D-80799 München (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: CA, NZ, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.</p>

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING ULTRA-PURE ALGINATES

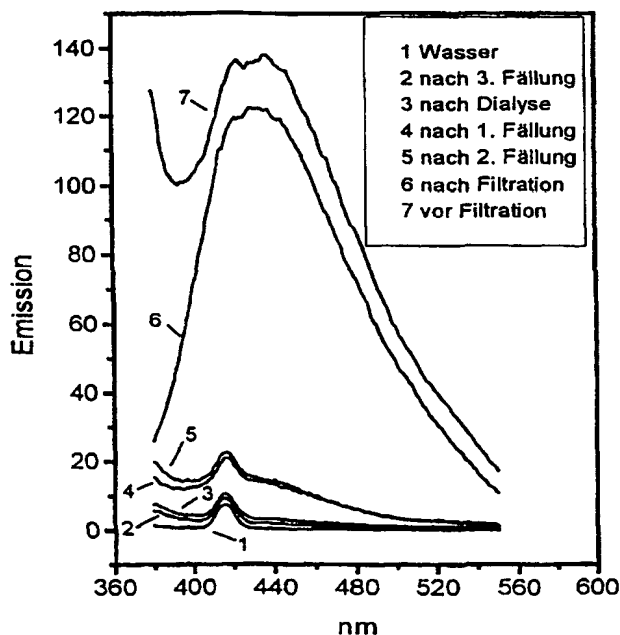
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR GEWINNUNG HOCHGEREINIGTER ALGINATE

(57) Abstract

The present invention relates to a method for obtaining a composition of ultra-pure alginate, wherein said method comprises the following steps: extracting a material consisting of algae or raw alginate using a complexing agent in a solution; allowing the cellular constituents and the particles contained in the solution to settle; filtering the solution; precipitating the alginate contained in the solution and recovering the precipitated alginate. An alginate composition in the form of a mixed polymer consisting of mannuronic and guluronic acids has a ratio between the mannuronic acid and the guluronic acid of about 1 to 90 % and an average molecular weight of 1000 kD or above.

(57) Zusammenfassung

Ein Verfahren zur Gewinnung einer hochgereinigten Alginatzusammensetzung enthält die Schritte: Extrahieren von Algenmaterial oder Rohalginat mit einem Komplexbildner in einer Lösung, Sedimentieren von Zellbestandteilen und Partikeln aus der Lösung, Filtern der Lösung, Ausfällen von Alginat aus der Lösung und Sammeln des gefällten Alginats. Eine als Mischpolymer aus Mannuronsäure und Guluronsäure bestehende Alginatzusammensetzung besitzt ein Verhältnis von Mannuronsäure zu Guluronsäure im Bereich von 1 % bis 90 % und ein mittleres Molekulargewicht bis zu oder oberhalb von 1.000 kD.



1...WATER  
2...AFTER 3rd PRECIP.  
3...AFTER DIOLYSIS  
4...AFTER 1st PRECIP.  
5...AFTER 2nd PRECIP.  
6...AFTER FILTRATION  
7...BEFORE FILTRATION

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

### Verfahren zur Gewinnung hochgereinigter Alginat

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung hochgereinigter Alginat, insbesondere aus Braunalgen, und mit diesem Verfahren hergestellte Alginat mit einem hohen Polymerisationsgrad sowie deren Verwendung.

Alginat besitzen zahlreiche Anwendungen im Bereich der Lebensmitteltechnik (z.B. Askar in "Alimenta", Bd. 21, 1982, S. 165 ff.) und in der Textiltechnik, in zunehmendem Maße jedoch auch in der Pharmazie, Medizin, Biochemie und Biotechnologie. Die nach den bisher bekannten Verfahren aus Algenpflanzen gewonnenen Alginat (Übersicht beispielsweise in D.J. McHugh: "Production and Utilization of Products from Commercial Seaweeds" in "FAO Fisheries Technical Papers", Bd. 288, 1987, Chap. 2) sind durch Schwankungen der Zusammensetzung und der Struktur sowie durch Verunreinigungen gekennzeichnet. Dies ergibt sich daraus, daß das Rohalginat aus Biomasse extrahiert wird, die aus Wildpopulationen gewonnen wird. Die insbesondere in Küstengewässern wachsenden Algenpopulationen sind zahlreichen geographischen, saisonalen und stofflichen (Umweltverschmutzung) Einflüssen ausgesetzt. Hinzu kommt, daß bei der Ernte die Algen ggf. gemeinsam mit Fremdstoffen eingesammelt und zur Konservierung bzw. zur Entfärbung einer chemischen Behandlung (z.B. mit Formalin und/oder Hypochlorid) unterzogen werden.

Die bis jetzt verfügbaren Rohalginat sind daher Mischpolymere variabler Struktur mit Verunreinigungen, zu denen insbesondere toxische Chemikalien zählen können. Da in der Lebensmittel- und Textiltechnik vorrangig Interesse an den gelbildenden Eigenschaften der Alginat besteht, wurden Verfahren

zur Nachreinigung oder Reinigung der Rohalginatate, wie sie im folgenden erläutert werden, erst für die biologisch-medizinischen Anwendungen entwickelt.

Verfahren zur Reinigung von Alginaten (wie sie z.B. von den Unternehmen Keltone LV oder Kelco Nutrasweet verfügbar sind) werden beispielsweise in DE-OS 4 204 012, US-A 5 429 821 (bzw. US-A 5 656 468) und in der Publikation von P. De Vos et al. in "Diabetologia" (Bd. 40, 1997, S. 262 ff.) beschrieben. Diese Verfahren besitzen generell die Nachteile eines hohen Energieaufwandes (Anwendungen einer Elektrophorese, Gefrier-trocknung oder Zentrifugation, Erhitzung oder Kochen), einer hohen Umweltbelastung (Verwendung von Säuren wie HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, biologisch nicht-abbaubaren Lösungsmitteln wie CHCl<sub>3</sub> oder Schwermetallionen wie beispielsweise Barium, Blei oder Kadmi-um) und einer Beschränkung des erzielbaren mittleren Moleku-largewichts des gereinigten Endmaterials. Weitere Nachteile der herkömmlichen Verfahren ergeben sich im einzelnen aus den folgenden Erläuterungen:

Bei dem aus DE-OS 42 04 012 bekannten Verfahren wird eine Rohalginatlösung einer Behandlung mit einem Komplexbildner, einer Säureextraktion bei hohen Temperaturen (rund 70 °C), einer Waschung, einer Behandlung mit konzentriertem Alkohol (rund 80 %) und einer weiteren Behandlung mit einem Komplex-bildner ausgesetzt. Anschließend folgt ein Dialysevorgang und eine Gefriertrocknung (oder Elektrophorese oder Zentrifugati-on) zur Gewinnung des gereinigten Alginats. Dieses Verfahren ist wegen des hohen Energieaufwands, der großen Anzahl von Verfahrensschritten, dem Einsatz von toxischen Materialien (z.B. Barium als Komplexbildner) und der Beschränkung auf Alginat (< 500 kD) nachteilig. Ein besonderes Problem ist jedoch, daß der Reinigungseffekt dieses Verfahrens nur be-schränkt ist.

In DE-OS 42 04 012 werden die gereinigten Alginatate zwar als mitogenfreie Substanzen benannt, dies jedoch lediglich unter der Annahme einer Mitogenfreiheit, falls in vorbestimmten Tierversuchen keine Entzündungsreaktionen beobachtet werden, sowie einer Unbedenklichkeit weiterer Komponenten, die im hochgereinigten Alginat verblieben. Es hat sich jedoch gezeigt, daß die am Ende der 80er Jahre entwickelten und in DE-OS 42 04 012 implementierten Tierversuche nicht geeignet sind, eine Mitogenfreiheit nachzuweisen, die den Anforderungen der modernen biomedizinischen Anwendungen, z.B. der Implantationstechnik, erfüllt. So wurden die Tierversuche beim herkömmlichen Reinigungsverfahren mit sogenannten Lewis-Ratten durchgeführt. Inzwischen konnte jedoch durch G. Klöck et al. in "Biomaterials" (Bd. 18, 1997, S. 707ff) und durch P. Gröhn (Dissertation Universität Würzburg, 1998) nachgewiesen werden, daß die Lewis-Ratten eine relativ geringe Empfindlichkeit gegenüber mitogenen Substanzen besitzen. Implantierte Alginat-Kapseln, die bei Lewis-Ratten nach drei Wochen keine Entzündungsreaktionen auslösten, führten beispielsweise bei sogenannten BB-OK-Ratten ("Bio Breeding / Ottawa Karlsruhe") zu Entzündungsreaktionen. Daraus ergibt sich, daß die aus DE-OS 42 04 012 bekannten mitogenfreien Substanzen tatsächlich nicht als hochgereinigt betrachtet werden können und wegen verminderter Biokompatibilität bei biomedizinischen Anwendungen nur beschränkt einsetzbar sind.

Bei dem aus US-A 5,429,821 bzw. US-A 5,656,468 bekannten Reinigungsverfahren wird ebenfalls eine Säurefällung durchgeführt. Es sind wiederum Hochtemperaturverfahrensschritte und zur endgültigen Alginatgewinnung eine Zentrifugation, Elektrophorese oder Gefriertrocknung erforderlich. Die nach diesem Verfahren gewonnenen Alginatate sind auf Molekulargewichte unterhalb 200 kD beschränkt. Es folgt eine Trocknung bei 80°C, bei der im Mischpolymer Trocknungsartefakte durch Struktur- oder Stoffumsetzungen entstehen können.

Ein besonderes Problem stellt die Beschränkung auf relativ geringe Molekulargewichte dar. So ist beispielsweise aus "Immobilized Enzymes" von J. Chibata (A Halsted Press Book, John Wiley & Sons, 1978) bekannt, daß die Bio-Toxizität von Materialien mit der Zunahme des Molekulargewichts abnimmt.

Schließlich ist auch das oben genannte Verfahren nach P. de Vos et al. durch zahlreiche Verfahrensschritte, einschließlich einer Säurefällung, dem Einsatz toxischer Chemikalien (Chloroform), die Verwendung hochkonzentrierten Ethanols (rund 70%) und die Anwendung einer Zentrifugation, Elektrophorese oder Gefriertrocknung gekennzeichnet.

Ein weiterer Nachteil sämtlicher Reinigungsverfahren besteht in deren Beschränkung auf die Reinigung kommerziell verfügbarer Rohalginat. Die Verfahren sind nicht auf Frischmaterial oder geerntete Biomasse anwendbar. Außerdem sind die Verfahren aufgrund der umständlichen Verfahrensführung, des Energieaufwands und dem Einsatz toxischer Chemikalien für eine großtechnische Anwendung nicht praktikabel.

Die Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren zur Gewinnung hochgereinigter Alginat anzugeben, mit dem die Nachteile herkömmlicher Reinigungsverfahren vermieden werden und die Herstellung eines hochgereinigten Alginats, insbesondere in großtechnischem Maßstab, ermöglicht wird. Die Aufgabe der Erfindung ist es auch, ein neuartiges Alginat, insbesondere mit einem gegenüber den herkömmlichen Alginaten erhöhten Molekulargewicht, bzw. einer erhöhten Viskosität, anzugeben.

Diese Aufgabe wird durch ein Verfahren bzw. eine Alginatzusammensetzung mit den Merkmalen gemäß den Patentansprüchen 1 bzw. 16 gelöst. Vorteilhafte Ausführungsformen und Verwendungen der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.

Unter einem hochgereinigten Alginat wird hier eine reproduzierbar herstellbare Alginatzusammensetzung verstanden, die vorbestimmte Molekulargewicht- und/oder Viskositätsparameter besitzt und eine hohe Sterilität, Reinheit und Biokompatibilität aufweist. Letzteres Merkmal bezieht sich beispielsweise darauf, daß mit erfindungsgemäß hochgereinigten Alginaten in autoimmundiabetischen BB/OK-Ratten auch nach mehrwöchiger Implantation keine oder eine vernachlässigbar geringe Fremdkörperreaktion ausgelöst wird.

Im Unterschied zu den herkömmlichen Reinigungsverfahren, die sämtlich an kommerziell verfügbare Rohalginat angepaßt sind, die jedoch Verschnitte oder Mischungen aus verschiedenen Algenmaterialien unter Einschluß von tierischen oder anderen Fremdmaterialien darstellen und somit grundsätzlich nicht hochgereinigtes Alginat ergeben können, wird erfindungsgemäß eine Alginatherstellung oder -gewinnung angegeben, die vorzugsweise von sauberem Algenfrischmaterial oder getrocknetem Algenmaterial als Ausgangsstoff ausgeht. Es ist insbesondere vorgesehen, daß zunächst das Algenmaterial in Gegenwart von Komplexbildnern behandelt wird, worauf mit einem Bindemittel in Form eines Granulats oder einem vergleichbaren porösen Material Zellbestandteile und Partikel sedimentiert werden. Nach einer Filtration erfolgt ein Fällungsschritt, vorzugsweise unter gleichzeitigem Einblasen eines Trägergases, unter dessen Wirkung das ausgefällte Alginat auf der Lösung aufschwimmt. Dieses Aufschäumen (Floatieren) ist nicht zwingend erforderlich. Ausgefälltes Alginat kann auch anderweitig aus der Lösung getrennt werden (z.B. durch einen Dekantiervorgang). Das derart gewonnene Alginat kann von der Lösungsoberfläche abgenommen oder als Rückstand nach dem Dekantieren aufgenommen und an Luft oder mit einer Filterpresse entwässert werden. Je nach Anwendungsfall wird dieser Reinigungsvorgang bzw. Teilschritte dieses Reinigungsvorgangs einmalig

oder mehrmals durchgeführt. Nach der letzten Reinigung erfolgt ein abschließendes Waschen und Lufttrocknen.

Diese Verfahrensweise besitzt die folgenden Vorteile. Bei der Alginatgewinnung wird vollständig auf toxische Chemikalien und Hochtemperaturbedingungen verzichtet. Die einzelnen Verfahrensschritte basieren auf an sich bekannten und einfach beherrschbaren Techniken, deren erfindungsgemäße Kombination besonders vorteilhaft in Bezug auf die Verfahrenskosten, den Materialaufwand und die Prozeßgeschwindigkeit ist. Es wird erstmalig im Gegensatz zu allen herkömmlichen Reinigungsversuchen eine Biokompatibilität des gewonnenen Alginatmaterials erreicht, so daß sich dessen Anwendungsgebiet erheblich, insbesondere in der Biologie und Medizin, erweitert. Das erfindungsgemäß hergestellte, biokompatible Produkt basiert ausschließlich auf Alginat. Das Alginat ist frei von Zusatzstoffen, wie z. B. Immunsuppressiva oder immunstimulierenden Substanzen oder Phenolen oder Phenol-ähnlichen Verbindungen, und kann in diesem Zustand unmittelbar angewendet werden.

Die Verfahrensschritte können ohne Probleme in verhältnismäßig kleinem Maßstab, z.B. am Ort der Algenernte, oder auch großtechnisch durchgeführt werden. Durch gezielte Steuerung der Fällungsreaktion werden Verunreinigungen durch Fucoidan ausgeschlossen, so daß sich die Reinheit des gewonnenen Alginats im Vergleich mit herkömmlichen Alginaten verbessert.

Die unmittelbare Verarbeitung von Algenmaterial besitzt eine Reihe von Vorteilen. Erstens werden Nachteile bei der herkömmlichen Algenernte, die sich durch Zersetzung und Verrottung am Ernteort und die konservierende Chemikalienbehandlung ergeben, vollständig vermeidbar. Zweitens lassen sich die geernteten Algen nach Organen oder Gewebeabschnitten trennen, bevor die Alginatgewinnung durchgeführt wird. Da sich die verschiedenen Algengewebe durch verschiedene Verhältnisse der



monomeren Mannuronsäure und Guluronsäure unterscheiden, können gezielt hochgereinigte Alginat mit einer bestimmten Mannuron-Guluron-Zusammensetzung hergestellt werden. Entsprechendes gilt für die Wahl bestimmter Gewebeteile zur Erzielung eines bestimmten Molekulargewichts. Es lassen sich erfindungsgemäße Alginatzusammensetzungen mit einem Molekulargewicht von mehr als 1.000 kD gewinnen. Schließlich kommt das erfindungsgemäße Verfahren ohne aufwendige Zentrifugations-schritte aus, wodurch die praktische Implementierung weiter vereinfacht wird. Die gezielte Gewinnung verschiedener Sorten hochreinen Alginats (z.B. guluronat- bzw. mannuronatreiches Alginat) läßt sich auch durch gezielte Gewinnung aus bestimmten Algenspezies (*Laminariales*, *Ectocarpales*, *Fucales* und anderen Alginat enthaltenden Algenspezies) realisieren, die sich durch die chemische Struktur des jeweiligen Alginats unterscheiden. Bei der organspezifischen Selektion werden hingen Phylloide, Cauloide und Rhizoide der Algen getrennt und separat verarbeitet. Diese Differenzierung kann weiter verfeinert werden, in dem einzelne Gewebe der verschiedenen Organe getrennt und das Alginat aus diesen Geweben separat gewonnen wird.

Die Erfindung ist insbesondere zur Alginatgewinnung aus frischem oder getrockneten Algenmaterial (insbesondere Braunalgen) angepaßt. Es ist jedoch auch möglich, mit dem erfindungsgemäß Verfahren kommerziell verfügbare Rohalginat zu reinigen oder das erfindungsgemäß Verfahren mit bestimmten Wasch- oder Trennschritten (z.B. Zentrifugation) zu kombinieren, die aus den herkömmlichen Reinigungsverfahren bekannt sind.

Vorteile der Erfindung ergeben sich auch daraus, daß das hochreine Alginat unmittelbar aus den Algenpflanzen unter Kontrolle sämtlicher Prozeßschritte gewonnen wird. Es werden toxische Chemikalien (insbesondere Lösungsmittel) vermieden,

so daß ein Einsatz für pharmazeutische Zwecke ohne weiteres möglich ist. Das Aufschäumen des ausgefällten Alginats stellt ein besonders einfaches und energiearmes Abtrennverfahren dar.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden die folgenden Verfahrensschritte zunächst an Algenfrischmaterial oder getrocknetem Material durchgeführt und anschließend an hochgereinigtem Alginat teilweise wiederholt, das beim ersten oder früheren Verfahrensabläufen gewonnen wurde. Das Algenmaterial bzw. kommerzielle Alginat wird im folgenden als Ausgangsmaterial bezeichnet.

Erfindungsgemäß wird das Ausgangsmaterial zunächst in Gegenwart von Komplexbildnern, ggf. in einer Sodalösung (siehe unten, Beispiel 1), extrahiert. Anschließend werden in der Lösung vorhandene Zellbestandteile und Partikel durch Zugabe eines Granulats und falls erforderlich durch Zugabe von Ionenaustauschern (wie z.B. Amberlit) zur Sedimentation gebracht und die Lösung anschließend gefiltert. Die Sedimentation kann alternativ unter Verwendung von Elektrographit (z.B. in Kügelchen-Form) vorgenommen werden. Dabei wird Elektrographit in die Lösung eingerührt und durch einen Stromfluß zwischen zwei in die Lösung eingehängten Elektroden aufgeladen. Die geladenen Elektrographitkügelchen zeigen eine Akkumulation von Verunreinigungen, die hier die betreffenden Zellbestandteile und Fremdpartikel umfassen. Die Sedimentation wird vorzugsweise bei der Reinigung kommerziellen Alginatmaterials eingesetzt, kann aber anwendungsabhängig auch ganz wegfallen (siehe unten, Beispiel 2). Der Filterschritt kann eine mehrfache Filterung mit schrittweise sich verringernder Porengröße z.B. von 15 µm bis 0.1 µm umfassen. Aus der gefilterten Lösung wird das Alginat durch ein geeignetes Fällungsmittel ausgefällt. Die Fällung wird vorzugsweise mit einem Alkohol (z.B. Ethanol) durchgeführt. Es kann aber auch

eine Säure oder ein anderes geeignetes Fällungsmittel verwendet werden. Die Alkoholkonzentration wird im Bereich zwischen 10% bis 50%, vorzugsweise im Bereich von 30% bis rd. 50% gewählt. In diesem Konzentrationsbereich bleiben Verunreinigungen durch immunologisch aktive Polysaccharide wie z.B. Fucoide in der Lösung und können somit vom Alginat getrennt werden. Falls höhere Alkoholkonzentrationen wie z.B. beim Verfahren nach De Vos et al. verwendet werden, so können diese unerwünschten Polysaccharide nicht abgetrennt werden. Während der Ausfällung erfolgt vorzugsweise eine Durchströmung der Lösung mit einem Treibgas (z.B. Luft). Das ausgefällte Alginat wird durch die eingeblasene Luft nach oben aufgetrieben und kann von der Lösungsoberfläche leicht mit einer geeigneten Einrichtung (z.B. Netz, Sieb oder dergl.) von der Lösung abgetrennt werden. Anschließend wird das gesammelte Alginat mit einer Filterpresse entwässert.

Die genannten Verfahrensschritte werden anwendungsabhängig ganz, teilweise oder in teilweise modifizierter Form wiederholt. Nach dem letzten Verfahrensablauf wird das hochgereinigte Alginat in Ethanol und ggf. anschließend in Wasser gewaschen und bei Raumtemperatur luftgetrocknet.

Das gereinigte Alginat besitzt in Abhängigkeit vom Ausgangsmaterial ein Verhältnis der Monomeren Mannuronsäure und Gluronsäure im Bereich von 0.1 - 9 (entsprechend 1% bis 90% Mannuronsäure) und ein mittleres Molekulargewicht von ca. 10 kD bis mehr als 1000 kD. Derart gereinigtes, bei einer autoimmundiabetischen BB/OK Ratte implantiertes Alginat löst nach einer Implantationszeit von 3 Wochen keine oder nur eine sehr schwache Fremdkörperreaktion aus, wie im einzelnen unten erläutert wird.

Das beschriebene Verfahren zur Alginatgewinnung kann in Bezug auf das Fällungsmittel, die Wahl des Sedimentationsmittels,

die Wahl des inerten Treibgases, das Fällungsverfahren und/oder das Vorgehen beim Einsammeln des ausgefällten Alginats modifiziert werden. Anstelle des zur Sedimentation eingesetzten Kieselgur kann auch jedes andere absorbierende Material wie Elektrographite, Granulate, Cellulose, poröse Recycling-Materialien in Pulver- oder Partikelform verwendet werden. Es ist auch möglich, zur Sedimentation ein mit einem absorbierenden Material beschichtetes Rührwerkzeug zu verwenden.

Gegenstand der Erfindung ist auch ein hochgereinigtes Alginat, das als Mischpolymer aus Mannuronsäure und Guluronsäure in einem Verhältnis im Bereich von 1% bis 90%, insbesondere rd. 70%, besteht, wobei das mittlere Molekulargewicht größer als 1000 kD, mindestens jedoch größer als 250 kD, ist.

Erfindungsgemäße Alginat zeichnen sich aufgrund ihrer extremen Reinheit und aufgrund der schonenden Extraktion beim erfindungsgemäßen Verfahren durch charakteristische Stoffeigenschaften aus, die bei herkömmlichen Alginaten nicht gegeben sind. Diese Stoffeigenschaften umfassen sowohl charakteristische Parameter, die als Eigenschaften des Alginats direkt meßbar sind (z.B. Viskosität), als auch Parameter, die als Eigenschaften der erfindungsgemäß entfernten Verunreinigungen, deren vollständiges Fehlen oder vernachlässigbar geringes Auftreten auf die hohe Reinheit des erfindungsgemäßen Alginats hinweisen (z.B. Fluoreszenzeigenschaften von Verunreinigungen, Auslösung immunologischer Reaktionen bei Tierversuchen und in Zellkulturen etc.)

Ein erfindungsgemäßes Alginat zeichnet sich durch eine hohe Viskosität aus. Eine wässrige Lösung eines erfindungsgemäßen Alginats mit einer 0.1-%igen Konzentration besitzt eine Viskosität im Bereich von 10 bis 15 mPa s. Dies stellt einen erheblich höheren Wert gegenüber der Viskosität herkömmlicher

Alginatlösungen gleicher Konzentration (rd. 1 bis 5 mPa s) dar. Bei 0.5%igen Lösungen erfindungsgemäßer Alginatate ergibt sich eine Viskosität von 280 mPa s. Die Viskosität der Alginatlösungen werden mit einem Kugelrollviskosimeter (Typ: AMV-200, Anton Paar KG, Graz, Österreich) bestimmt. Aus den Viskositätswerten wird mittels der Verfahren nach Huggins ("J. Am. Chem. Soc.", Bd. 64, 1942, S. 2716 ff.) und Krämer ("Ind. Eng. Chem.", Bd. 30, 1938, S. 1200 ff.) das Molekulargewicht bestimmt. Es ergeben sich bei den erfindungsgemäßen Alginaten mittlere Molekulargewichte größer als 250 kD.

Erfindungsgemäße Alginatate sind frei von Phenolen und phenolähnlichen Verbindungen, insbesondere von Polyphenolen, die sich aus Phloroglucinol zusammensetzen, und Phenol-Protein-Verbindungen. Bei einer Anregungswellenlänge von 366 nm besitzen erfindungsgemäße Alginatate, abgesehen von einer Lösungsmittelfluoreszenz (Raman-Bande des Wassers) bei 418 nm im Spektralbereich von 380 bis 550 nm keine Fluoreszenzemissionen. Die Phenol- und Polyphenol-Freiheit erfindungsgemäßer Alginatate ergibt sich auch aus Farbttests unter Verwendung der Folin-Denis-Reaganz oder mit Dimethoxybenzaldehyd (DMBA). Erfindungsgemäße Alginatate besitzen bei diesen Farbttests, abgesehen von der Lösungsmittelabsorption, keine Extinktion.

Erfindungsgemäße Alginatate sind praktisch frei von Substanzen (z.B. Proteinen), die bei einer Wellenlänge von 350 nm absorbieren. Die Proteinfreiheit zeigt sich wiederum bei einer Fluoreszenzmessung mit einer Anregungswellenlänge von 270 nm, die, abgesehen von der Lösungsmittelfluoreszenz, im Spektralbereich von 300 bis 500 nm keine Fluoreszenzemission ergibt. Die Proteinfreiheit erfindungsgemäßer Alginatate wird auch mit dem photometrischen Proteinnachweis nach Bradford ("Anal. Biochem.", Bd. 72, 1976, S. 248 ff.) gezeigt.

Erfindungsgemäße Alginatate sind auch Endotoxin-frei. Endotoxine sind Verunreinigungen, die bei einer Implantation einer Immunreaktionreaktion des Empfängers auslösen können, welche aus den Zellenwänden der bakteriellen Begleitflora der Alginatate in herkömmliche Algenextrakte gelangen. Erfindungsgemäße Alginatlösungen (Konzentration: 0,25%) besitzen einen Endotoxingehalt von weniger als 14,5 Endotoxineinheiten pro Milliliter Alginatlösung (Meßverfahren: quantitative Endotoxinbestimmung mit Limulus Amöbozyten Lysat-Test).

Erfindungsgemäße Alginatate sind im Gegensatz zu herkömmlichen Alginatextrakten biokompatibel, soweit dies durch die unten erläuterten XTT- und MTT-Tests und Versuche an BB/OK-Ratten gezeigt wird.

Bevorzugte Anwendungen eines derartigen, hochgereinigten Alginats sind die Transplantationschirurgie, bei der lebende Zellen in einer Alginatkapsel eingeschlossen und ohne die Auslösung immunologischer Reaktionen im Körper eines Lebewesens implantiert werden. Das hochgereinigte Alginat kann auch in den Gebieten der Lebensmittel- oder Textiltechnik zur Erhöhung der Verträglichkeit bestimmter Nahrungsmittel oder Stoffe eingesetzt werden. Es wird betont, daß das oben erläuterte erfindungsgemäße Verfahren auch zur Herstellung hochgereinigten Alginats mit geringerem Molekulargewicht bis zu 1000 kD geeignet ist.

Weitere Vorteile und Einzelheiten der Erfindung werden im folgenden, insbesondere unter Bezug auf die beigefügten Figuren beschrieben. Es zeigen:

Fig. 1                    eine Schnittansicht eines Düsenkopfes zur Herstellung von Alginatkapseln,

- Fig. 2            Fluoreszenzspektren zur Demonstration der Phenolfreiheit erfindungsgemäßer Alginat,
- Fig. 3            Fluoreszenzspektren zur Demonstration der Proteinfreiheit erfindungsgemäßer Alginat, und
- Fig. 4            Ergebnisse eines Lymphozytenstimulationstests zur Demonstration der Immunogenfreiheit erfindungsgemäßer Alginat.

#### Ausführungsbeispiele

Im folgenden werden konkrete Ausgestaltungen der oben allgemein erläuterten Verfahrensweise an Beispielen beschrieben. Dabei wird ohne Beschränkung auf die Reinigung bzw. Verwendung von Alginatmaterial auf der Basis von Braunalgen Bezug genommen. Anstelle von Braunalgen können allgemein alle alginatenthaltenden Salzwasser- oder Süßwasser-Algen verwendet werden. Die Reinigung von Alginatmaterial aus anderen Algen erfolgt in entsprechender Weise.

Das Ausgangsmaterial umfaßt (1) frische Braunalgen, (2) getrocknete Braunalgen oder (3) kommerzielles Alginat. Als Frischmaterial (1) werden in der Natur oder in einem Kultivierungsraum oder Gewächshaus geerntete Braunalgen oder Braunalgenteile aus vorbestimmten Entwicklungsstadien des Lebenszyklus der Algen oder entsprechendes in einem homogenen Bioreaktor kultiviertes Algenmaterial verwendet. Das Trockenmaterial (2) besteht aus getrockneten Braunalgen, die entsprechend diesen Alternativen gewonnen wurden.

Beispiel 1

Beim ersten Beispiel wird auf 80 g trockene und anschließend wieder hydratisierte (gewässerte) Algen Bezug genommen. Bei kommerziellem Alginat, dessen Trockengewicht nur rund 1% des Frischgewichts ausmacht, wird entsprechend weniger Trockengewicht eingesetzt. Das trockene Material (z.B. *Laminariales*, *Fucales*) gemäß (2) oder (3) wird je nach Ausgangsmenge für mehrere Stunden in warmem Leitungswasser gewässert. Dies kann beispielsweise bei Leitungswasser mit einer Temperatur von 40°C mindestens 3 bis 4 Stunden dauern, wobei das Wasser mehrfach ausgetauscht wird oder fließt. Bei Verwendung von kälterem Wasser muß die Wässerung entsprechend verlängert werden. Die Wässerung erfolgt vorzugsweise dadurch, daß das Material in einem wasserdurchlässigen Behältnis (z.B. wasserdurchlässiger Sack) in fließendes Leitungswasser gehängt wird. Bei Wässerung in stehendem Wasser wird das Material z. B. bei einem Ausgangstrockengewicht von rund 80 g getrockneter Algen (entsprechend 10% des Frischgewichts von rund 800 g) in 3 bis 6 l Wasser gewässert. Nach der Wässerung erfolgt die Verfahrensweise für alle drei genannten Arten von Ausgangsmaterial (1) bis (3) analog.

Das Material wird in rund 5.7 l einer 25 mM EDTA-Lösung (Aqua dest. bzw. demineralisiertes Wasser) suspendiert (bzw. im Falle von kommerziellem Alginat (3) gelöst). Die Einwirkung der Ethylendiamintetraessigsäure(EDTA)-Lösung erfolgt mindestens 10 Stunden. Die Einwirkungszeit kann verkürzt werden, wenn die Suspension laufend gerührt wird. Mit steigender Einwirkungszeit verbessert sich die Ausbeute an gereinigtem Alginat. Bei einer ungerührten Suspension kann beispielsweise eine Einwirkungszeit von mehreren Tagen vorgesehen sein.



Anschließend werden 5%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  und EDTA als Festsubstanzen unter Rühren zugegeben. Die EDTA-Menge wird derart gewählt, daß eine 50 mM-EDTA-Lösung gebildet wird. Die Suspension wird so lange gerührt, bis eine homogene (feindisperse) Lösung vorliegt. Dieser Zustand ist insbesondere dann erreicht, wenn in der Lösung nur noch wenige Zellbestandteile sichtbar sind. Anschließend werden rund 34 g Kieselgur unter Rühren zugeetzt und die Lösung für mindestens 2 Tage gerührt. Es ist alternativ möglich, das Kieselgur zusammen mit  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  und EDTA unter Rühren zuzugeben. Es kann anwendungsabhängig (insbesondere in Abhängigkeit vom verwendeten Braunalgenmaterial) vorgesehen sein, zusätzlich Ionenaustauschermaterial gleichzeitig mit dem Kieselgur oder Elektrographit zuzugeben. Es ist beispielsweise möglich, zusätzlich 34.2 g Amberlit als Ionenaustauscher zuzusetzen, das vorher einer Reinigung unterzogen worden ist. Diese Reinigung dient der Entfernung toxischer Substanzen und umfaßt eine Wässerung in fließendem Wasser (Dauer rund 3 Stunden).

Nach der Kieselgurbehandlung wird das Volumen der Lösung mit demineralisiertem Wasser auf 22.8 l verdünnt, um die Viskosität zu verringern. Die Verdünnung wird allgemein derart gewählt, daß die Lösung anschließend filtrierbar ist. Der Wasserzusatz hängt somit insbesondere auch vom verwendeten Braunalgenmaterial ab. Nach der Verdünnung und kurzzeitigem Durchrühren wird die Lösung für mindestens 10 Stunden stehen gelassen, um feste Bestandteile sedimentieren zu lassen. Die Standzeit kann auch im Bereich von Tagen liegen. Der Überstand wird abdekantiert und filtriert. Die Filtration erfolgt mehrstufig, wobei erst ein Tiefenfilter mit einer Porengröße von 15  $\mu\text{m}$  und anschließend ein Filter mit einer Porengröße von 0.1  $\mu\text{m}$  verwendet wird.

Anschließend folgt ein Salzzusatz zu dem Filtrat. Es wird der Zusatz von KCl bevorzugt, wobei anwendungsabhängig auch andere, entsprechende Salze eingesetzt werden können. Es wird soviel KCl als Festsubstanz zugegeben, daß sich eine 0.13 M KCl-Lösung ergibt.

Anschließend folgt eine Ethanol-Fällung. Die Menge des Ethanolzusatzes hängt davon ab, wieviel Fucoïdan sich im Material befindet. Bei der ersten Ethanol-fällung sollte die Ethanolendkonzentration bei Anwesenheit von Fucoïdan nicht 40% überschreiten, da sonst das Fucoïdan mit ausfällt. Beim angegebenen Beispiel werden rund 12 l 99%iger Ethanol zugesetzt, so daß die Endkonzentration des Ethanol in der Gesamtlösung bei rund 34% liegt. Es kann auch vorgesehen sein, daß die Ethanolkonzentration in Abhängigkeit von der Art des Ausfällens des Alginats gewählt wird. Durch Variation der Ethanolkonzentration kann erzielt werden, daß das Alginat fadenförmig oder watteförmig ausfällt. Eine derartige Ausfällung wird nach Möglichkeit angestrebt, damit das Alginat aufschwimmt bzw. weiterverarbeitet werden kann, wie dies unten erläutert wird.

Anstelle von Ethanol kann auch mindestens ein anderer Alkohol (z. B. Isopropanol) oder eine Fällungssäure zugegeben werden, wobei die Konzentration sich nach den genannten Kriterien richtet.

Während der Fällung erfolgt eine Durchströmung der Lösung mit einem Treibgas (z.B. Luft). Das ausgefällte Alginat wird während der Fällung, d.h. im Entstehen, durch die eingeblasene Luft nach oben aufgetrieben und kann von der Lösungsoberfläche leicht mit einer geeigneten Einrichtung (z.B. Netz, Sieb, oder dgl.) von der Lösung abgehoben werden. Das ausgefällte Alginat kann auch ohne Treibgaszusatz durch Dekantieren oder Umrühren mit einer Röhreinrichtung, an der ausgefälltes Algi-

nat haften bleibt, gesammelt werden. Anschließend wird das gesammelte Alginat mit einer Filterpresse entwässert, um dem stark hygroskopischen Material zumindest teilweise Wasser zu entziehen.

Die bis hier realisierten Verfahrensschritte werden anwendungsabhängig ganz, teilweise oder teilweise unter modifizierten Bedingungen wiederholt. Danach wird eine Weiterverarbeitung des gefällten Alginats wie folgt durchgeführt.

Das gefällte Alginat wird in 11.4 l und 0.5 M-KCl/10 mM-EDTA-Lösung aufgelöst. Die Auflösung erfolgt unter Rühren, bis eine homogene Lösung vorliegt. Anschließend folgt eine zweite Fällung mit rund 10 l einer 99%igen Ethanollösung unter Treibgaszuführung. Unter diesen Bedingungen beträgt die Alkoholkonzentration in der Gesamtlösung rund 44%. Bei dieser zweiten Fällung kann eine höhere Alkohol-(bzw. Säure-)Konzentration gewählt werden, da das Fucoïdan (siehe oben) bereits abgetrennt ist. Allerdings wird die Konzentration des Fällungsmittels wiederum so eingestellt, daß die Bildung von faden- oder watteartigem Alginat gefördert wird. Bei nicht-optimaler Alkoholkonzentration ist das Alginat gelatineartig und kann somit nicht flotiert werden (Aufschwimmen unter Treibgaswirkung).

Anschließend wird das gefällte Alginat wieder durch eine Filterpresse entwässert und mehrmals mit der 10-fachen Menge einer 70%igen Ethanollösung gewaschen. Anschließend wird das Material bei Raumtemperatur getrocknet. Die Trocknung kann anwendungsabhängig unter sterilen Bedingungen erfolgen. Es kann nach der Waschung mit Ethanol vorgesehen sein, das Material mehrfach mit demineralisiertem Wasser zu waschen oder gegen demineralisiertes Wasser zu dialysieren, um Restspuren von Begleitstoffen zu entfernen.

Die Zahl der erfindungsgemäß durchgeführten Fällungen richtet sich nach den Verunreinigungen bzw. den toxischen Beiprodukten im Ausgangsmaterial.

Die Gewebeverträglichkeit des entsprechend dem Beispiel gewonnenen Alginats wird wie folgt geprüft. Es werden Implantationsexperimente mit normoglykämischen ( $6.1 \pm 0.4$  mM Plasmaglucose), diabetisanfälligen BB/OK-Ratten (200 + 25 Tage alt) durchgeführt. Diese Ratten besitzen eine erheblich höhere Empfindlichkeit gegen Verunreinigungen in Alginaten als die oben genannten Lewisratten.

Ba<sup>2+</sup>-Alginatkapseln wurden aus dem hochgereinigten Alginat entsprechend der Verfahrensweise hergestellt, die in DE-OS 42 04 012 A1 beschrieben ist. Die Alginatkapseln besitzen einen mittleren Durchmesser von 200 µm bis 400 µm. Die Implantation erfolgte unter die Nierenkapsel der BB/OK-Ratten. Die Empfängertiere blieben normoglykämisch und zeigten keinen Verlust an Körpergewicht. Nach drei Wochen wurden die Tiere getötet, die Nieren herausgenommen und in Bouin'scher Lösung fixiert. Nach Einbettung in Paraffin folgte die Präparation von 7 µm-Schnitten. Jeder 20. Schnitt von zwei unabhängigen Individuen wurde zur histologischen Untersuchung herangezogen.

Das Ergebnis der Untersuchung für verschiedene Proben im Vergleich mit Rohalginat ist in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Resultat für zwei unabhängige Proben:

Probe	Ratte #	Histologische Beurteilung (Fibrose)	Endotoxingehalt einer 0,25%igen Lösung des Alginats
S1	V159	(+)	1 EU/ml
	V161	+	
S2	V454	0	3,5 EU/ml
Rohalginat	V12	++++	> 1000 EU/ml

(Legende:

0: keine Reaktion, (+): sehr schwache Reaktion, +: schwache Reaktion, ++++: sehr starke Fibrose)

Es zeigt sich, daß die Implantation mit erfindungsgemäßem Alginat keine oder nur eine sehr schwache Reaktion auslöst, wohingegen bei Implantation mit kommerziell angebotenem Rohalginat eine sehr starke Fibrose auftritt.

Der Endotoxingehalt, der charakteristisch für einen potentiellen Bakterienbefall ist, zeigt im Falle der hochgereinigten Alginate hervorragende, nahezu vernachlässigbare Werte, wohingegen der Vergleichswert des kommerziellen Rohalginats rd. tausendfach größer ist.

Am erfindungsgemäß hergestellten, hochgereinigten Alginat wurde auch unter Anwendung der folgenden Testverfahren festgestellt, daß keine Verunreinigungen von toxischen Substanzen gegeben ist. Die Testverfahren umfassen insbesondere fluoreszenzspektroskopische Verfahren und Endotoxin- oder Mitogenaktivitäts-Essays, wie sie von G. Klöck et al. in "Appl. Microbiol. Biotechnology" (Band 40, 1994, Seite 638 ff) und in "Biomaterials" (Band 18, 1997, Seite 707) beschrieben sind, NMR-spektroskopische Verfahren, die Bestimmung des antioxidativen Potentials des hochgereinigten Alginats durch Ermittlung der Reaktion auf Zugabe von HOCl und über die Bestimmung der oxidativen Aktivität neutrophiler Granolocyten unter Zuhilfenahme der Chemolumineszenz (siehe K. Arnold in "Abhandlungen der sächsischen Akademie der Wissenschaften zu

Leipzig", Band 58, 1997, Heft 5) und das Verfahren der "Free Flow Electrophoresis" wie es von U. Zimmermann et al. in "Electrophoresis" (Band 13, 1992, Seite 269) beschrieben ist. Eine toxische Verunreinigung wurde mit diesen Verfahren nicht bestimmt.

Nach den in der oben genannten Publikation von G. Klöck et al. (1997) angegebenen Verfahren wurde ferner das Verhältnis von Mannuron- zu Guluronsäure mit Hilfe der sogenannten "Circular Dichroismus-Spectroscopy" bzw. mit der IR-Spektroskopie ermittelt. Ferner wurde auch das Molekulargewicht über die Bestimmung der Viskosität ermittelt.

Die mit  $Ba^{2+}$  vernetzten Kapseln aus Alginat besitzen eine hervorragende Elastizität, wie es mit Hilfe von Kompressionsmessungen nachgewiesen werden konnte.

#### Beispiel 2

Beim zweiten Beispiel wird auf 10 g trockene Algen Bezug genommen. Bei größeren Ausgangsmassen sind die im folgenden gegebenen quantitativen Größen entsprechend linear umzurechnen. Im Unterschied zu Beispiel 1 erfolgt die Alginatgewinnung bzw. -reinigung vorteilhafterweise ohne eine Wässerung oder Quellung. Das trockene Ausgangsmaterial wird vielmehr unmittelbar in eine EDTA-Lösung gegeben. Die EDTA-Lösung besitzt eine Konzentration im Bereich von rd. 10 bis 50 mM. Die Suspension wird 24 Stunden gerührt und anschließend zur Entfernung von Festmaterial gesiebt. Ein weiterer Vorteil der beim zweiten Beispiel erläuterten Verfahrensweise besteht darin, daß der EDTA-Verbrauch und auch der Alkoholeinsatz verringert wird.

Es kann vorgesehen sein, daß der Suspension während der EDTA-Behandlung zusätzlich Aktivkohle zugesetzt wird. Die Masse

der zugesetzten Aktivkohle beträgt vorzugsweise etwa 10 bis 200 % der eingewogenen Algentrockenmasse.

Anschließend erfolgt unmittelbar ohne einen gesonderten Sedimentationsschritt eine Filtration der Suspension. Die Filtration erfolgt zweistufig, wobei erst ein Vor- oder Tiefenfilter mit einer Porengröße von 15  $\mu\text{m}$  und anschließend ein Filter mit einer Porengröße von 0.2  $\mu\text{m}$  verwendet wird.

Nach einem Salzzusatz zu dem Filtrat wie bei Beispiel 1 (z. B. Bildung einer 0.13 M KCl-Lösung) folgen mehrere Ethanol-Fällungen. Für die erste Fällung wird 99%iger Ethanol (vergällt mit Aceton) zugesetzt, so daß sich eine Endkonzentration des Ethanol in der Gesamtlösung von 37.5% ergibt. Das Fällungsprodukt wird aufgesammelt und in eine 0.5M KCl-Lösung (ohne EDTA) gegeben. Das Volumen der KCl-Lösung wird auf ein Drittel des Lösungsvolumens vor der Fällung eingestellt.

Für die zweite Fällung wird wiederum 99%iger Ethanol (vergällt mit Aceton) zugesetzt, so daß sich hier eine Endkonzentration des Ethanol in der Gesamtlösung von 44% ergibt. Das Fällungsprodukt wird aufgesammelt und in bidestilliertes Wasser mit einem Volumen entsprechend dem Volumen der KCl-Lösung nach der ersten Fällung gegeben.

Vor der dritten Fällung kann eine Dialyse des bei der zweiten Fällung gewonnenen Fällungsprodukts durchgeführt werden. Die Dialyse, die kein zwingendes Verfahrensmerkmal ist, erfolgt für die Dauer von 3 Tagen mit 3 Wasserwechseln pro Tag. Für die dritte Fällung wird wiederum 99%iger Ethanol (vergällt mit Aceton) zur Einstellung einer Endkonzentration des Ethanol in der Gesamtlösung von 50% zugesetzt. Das Fällungsprodukt wird aufgesammelt und getrocknet.

Beispiel 3

Im folgenden wird ein Beispiel zur Transplantationschirurgie, nämlich die Mikrokapsulierung Langerhans'scher Inseln, beschrieben.

Isolierte Langerhans'sche Inseln wurden in einer Lösung von 0.9% NaCl und 0.5% des gereinigten Alginats suspendiert. Diese Suspension wurde durch eine in Fig. 1 gezeigte Sprühdüse 10 fein zertropft. Die Düse hat ein bewegliches inneres Hohlrohr 20 (innere Düse) mit Lüranschluß (innerer Durchmesser 350 µm bzw. 2 mm), ein mittleres Hohlrohr 30 (mittlere Düse) mit einem Durchmesser von 1 mm bzw. 3.5 mm und einen äußeren Kanal 40, der in einem justierbaren Luftfokussierkopf 50 mündet. Diese Elemente wurden an einem Düsenkopf 60 montiert, an dem sich Druckluft- und Lüranschluß befinden.

Die Inselsuspension in Alginat wird durch den zentralen Düsenkanal gedrückt. Durch den umgebenden Kanal wird eine Lösung von 0.5 bis 2% des Alginats in 0.9% Kochsalzlösung appliziert. Bei den am Düsenausgang entstehenden Tropfen umschließt auf diese Weise die äußere Alginatlösung (0.5 bis 2%) die in der 0.5%igen Alginatlösung suspendierten Inseln. Durch den äußeren, dritten Kanal wird Druckluft zugeführt, welche die Tropfen von der Düsenöffnung abschert. Die Druckluft wurde auf 30 bis 40 mbar (7 bis 8 l/min) eingestellt. Die Alginattropfen 70 wurden in 40 mL Vernetzerlösung mit 20 mM BaCl<sub>2</sub> und 5 mM Histidin geliert. Die Vernetzerlösung ist mit NaCl auf eine physiologische Konzentration (290 mOsmol) eingestellt. Die Kapseln wurden dann dreimal entsprechend mit isotoner Kochsalzlösung gewaschen.

Mit dem erfindungsgemäßen Alginat können allgemein Umhüllungen für allogene und xenogene Gewebe, insbesondere endokrines Gewebe, hergestellt werden.



Weitere Charakterisierung erfindungsgemäßen Alginatmaterials

## 1. Fluorimetrischer Phenolnachweis

Erfindungsgemäße Alginatate enthalten keine störenden Verunreinigungen auf der Basis von Phenolen, Polyphenolen und anderen Phenolverbindungen. Diese Phenolfreiheit bedeutet, daß die genannten Verunreinigungen nicht oder in einem derart geringen Gehalt in den Alginaten enthalten sind, daß Anwendungen in der Biologie und Medizin, insbesondere die obengenannten Anwendungen, nicht durch Immunreaktionen oder dergleichen gestört werden. Die Phenolfreiheit wird mit einer fluorimetrischen Analyse nachgewiesen, die von G. Skajk-Braek et al. (s. "Biotechnology and Bioengineering", Bd. 33, 1989, S. 90 ff.) beschrieben worden ist. Die Fluoreszenzmessung wird mit einem Spektrometer LS50 (Perkin-Elmer, Beaconsfield) durchgeführt. Bei einer Anregungswellenlänge von 366 nm ergeben sich die in Fig. 2 gezeigten Fluoreszenzspektren an Lösungsproben während der Reinigung gemäß Beispiel 2. Vor und nach der anfänglichen Filtration zeigt die Alginatlösung eine starke Fluoreszenz im Bereich zwischen 380 und 550 nm (obere Spektren). Nach den Filtrations- und Fällungsschritten ist die Fluoreszenz erheblich vermindert. Die Konzentration der Endlösung beträgt rd. 0,2-0,3%. Es verbleibt lediglich ein Fluoreszenzmaximum bei 418 nm, was der Lösungsmittelfluoreszenz entspricht. Im erfindungsgemäß gereinigten Alginat ist die Fluoreszenz der Phenole und Phenolverbindungen auf weniger als rd. 10% gegenüber der ungereinigten Alginatlösung reduziert.

Fig. 2 zeigt, daß die Phenolgehalte im Laufe des erfindungsgemäßen Verfahrens drastisch abnehmen und daß das gereinigte Alginat eine Emission zeigt, die nur noch geringfügig über den Werten hochreinen Wassers liegt.

## 2. Fluorimetrischer Proteinnachweis

Die Proteinfreiheit erfindungsgemäßer Alginatate wird wie bei der Analyse gemäß 1. fluorimetrisch nachgewiesen. Fig. 3 zeigt, daß bei einer Anregungswellenlänge von 270 nm vor der Reinigung eine starke Emission im Bereich von 300 bis 500 nm gemessen wird. Diese Emission fällt im Laufe der Reinigung auf einen Wert unterhalb von 20% der Fluoreszenz der ungereinigten Alginatlösung ab. Nach der letzten Fällung ist die Fluoreszenz nicht mehr nachweisbar oder vernachlässigbar klein.

## 3. Phenolnachweis nach Folin-Denis bzw. mit DMBA

Der Folin-Denis-Nachweis färbt sämtliche phenolhaltige Verbindungen. Erfindungsgemäß hergestellte Alginatate zeigen bei diesem Nachweise keine Extinktion. Der Folin-Denis-Nachweis wird unter den folgenden Bedingungen durchgeführt:

Die zu analysierende Alginatlösung (0,5 ml) wird mit 1 ml Methanol zur Extraktion versetzt. Die Probe wird nach intensivem Schütteln für ca. 8h in den Kühlschrank gestellt. Das ausgefallene Alginat wird abzentrifugiert, 10 µl des Überstandes werden in 40 µl des Folin-Denis Reagenz (Fluka, Deisenhofen, Deutschland), 80 µl 1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  und 120 µl  $\text{H}_2\text{O}$  (Reihenfolge einhalten) gegeben. Nach intensivem Schütteln erfolgt die Farbentwicklung im Wasserbad bei 50°C für 30 min. Es folgt die Messung der optischen Dichte mit Hilfe eines Photometers bei einer Wellenlänge von 650 nm (oder 725 nm).

Auch beim Zusatz von Dimethoxybenzaldehyd (DMBA) zeigen die erfindungsgemäßen Alginatate keine photometrisch auswertbare Farbreaktion. Dieser Test wurde unter den folgenden Bedingungen ausgeführt: Die zu analysierende Alginatlösung (0,5 ml) wird mit 1 ml Methanol zur Extraktion versetzt. Die Probe wird nach intensivem Schütteln für ca. 8h in den Kühlschrank

gestellt. Das ausgefallene Alginat wird abzentrifugiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von 10 µl des Überstandes in die DMBA Lösung, die wie folgt hergestellt wurde: 2 g DMBA (Fluka, Deisenhofen, Deutschland) werden in 100 ml Eisessig gelöst. 16 ml HCl (37%) werden mit Eisessig auf 100 ml aufgefüllt. Beide Lösungen sind kurz vor der Verwendung 1:1 zum Arbeitsreagenz zu mischen.

Es folgt die Messung der optischen Dichte mit Hilfe eines Photometers bei einer Wellenlänge von 490 nm (oder 510 nm) gegen eine Eichreihe Phloroglucinol (Sigma, Deisenhofen, Deutschland).

#### 4. Proteinnachweis nach Bradford

Der Proteinnachweis nach Bradford (s. "Anal. Biochem.", Bd. 72, 1976, S. 248 ff.) basiert auf der Tatsache, daß der Farbstoff Coomassie brilliant blue sehr spezifisch an Proteine anbindet, wodurch es zu einem Farbumschlag von rot nach blau kommt. Die Intensität der Blaufärbung korreliert linear mit der Proteinmenge und kann photometrisch quantifiziert werden. Mit dieser Methode sind Proteine bis in den unteren µg-Bereich nachweisbar. Es wurden 10 µl einer 0,5%igen Alginatlösung untersucht. Als farbstoffhaltige Nachweissubstanz wurde das sogenannte Bradford-Reagenz (Hersteller Sigma, Steinheim, Deutschland) der Alginatlösung zugesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurde die Probenabsorption photometrisch bei 570 nm unter Verwendung eines "Thermomex Microplate Reader"-Gerätes (Hersteller Molecular Devices, Manlow Park, USA) gemessen. In der erfindungsgemäßen Alginatlösung wurden mit diesen Verfahren keine Proteine gefunden.

## 5. XTT- und MTT-Tests

Die Biokompatibilität der erfindungsgemäß gereinigten Alginate kann mit den folgenden Tests gezeigt werden. Lebende Zellen, wie Maus-Lymphozyten oder Fibroblasten werden für einige Tage mit den Alginaten in Kultur gehalten. Weisen die Alginate eine immunogene Wirkung auf, so werden die Zellen stimuliert oder inhibiert (um den Effekt der Stimulation zu verdeutlichen können zusätzliche Stimulanzien, z.B. LPS oder PHA in die Kultur gegeben werden). Die bei Lymphozyten erhöhte und bei Fibroblasten verminderte Stoffwechselaktivität kann anhand der Umsetzung eines Farbstoffs (XTT oder MTT) durch mitochondrielle Dehydrogenasen visualisiert und photometrisch quantifiziert werden. Bei erfindungsgemäß gereinigten Alginaten ist die Farbstoffumsetzung vernachlässigbar gering (s. Fig. 4), wohingegen bei kommerziellen Alginaten eine starke Farbstoffumsetzung nachweisbar ist. Fig. 4 zeigt die Ergebnisse der Farbtests für verschiedene LPS-Vorstimulierungen.

Die Kultivierung der Zellen wurde unter den folgenden Bedingungen durchgeführt. Die Lymphozytenzellsuspension ( $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml in Complete Growth Medium) wird mit verschiedenen Konzentrationen an Lipopolysacchariden (LPS, Endkonzentration: 0,01 µg/ml) und Alginatlösung (Endkonzentration: 0,05%) versetzt und 3 Tage bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C kultiviert. Danach wird die Suspension mit einer Lösung des Tetrazoliumsalzes (XTT oder MTT) und für weitere 6h inkubiert. Es folgt die Messung der optischen Dichte bei 450 nm (Referenzmessung bei 650 nm).

## 6. Versuche in BB/OK-Ratten

Wie oben bei Beispiel 1 beschrieben, kann die Biokompatibilität erfindungsgemäßer Alginate auch durch in vivo-Tests an BB/OK-Ratten gezeigt werden, deren Immunsystem eine erhöhte Makrophagenaktivität aufweist. Erfindungsgemäß gereinigtes

Alginat, das entsprechend den oben beschriebenen Schritten kapselförmig in Ratten-Nieren implantiert worden ist, verursacht nach 3 Wochen Inkubationszeit keine Fibrosen.

## 7. Elektrorotation

Die Biokompatibilität der erfindungsgemäß gereinigten Alginatate kann auch mit folgendem Test gezeigt werden. Lebende Zellen, wie Human-Lymphozyten oder Maus-Lymphozyten werden für einige Tage mit Alginaten in Kultur gehalten. Weisen die Alginatate eine immunogene Wirkung auf, reagieren die Zellen mit einer stark vergrößerten Membranoberfläche (Zunahme der Mikrovilli) (um diesen Effekt zu verdeutlichen können zusätzliche Stimulanzen, z.B. LPS oder PHA in die Kultur gegeben werden). Eine solche Zunahme läßt sich über eine Erhöhung in der spezifischen Membrankapazität  $C_m$  ermitteln. Die Elektrorotation der Zellen unter Wirkung hochfrequenter elektrischer Felder bietet eine Möglichkeit, diese Veränderungen der Lymphozytenmembran auf dem Einzelzellniveau nachzuweisen. Bei erfindungsgemäß gereinigten Alginaten läßt sich keine Erhöhung der spezifischen Membrankapazität messen, wohingegen bei kommerziellen Alginaten eine Erhöhung dieses Wertes nachweisbar ist.

Die Messungen wurden unter folgenden Bedingungen ausgeführt. Die Lymphozytenzellsuspension ( $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml in Complete Growth Medium) wird mit einer Alginatlösung (Endkonzentration: 0,05%) versetzt und 3 Tage bei 5%  $\text{CO}_2$  und  $37^\circ\text{C}$  kultiviert. Danach wird die Suspension 2 x in isoosmolaler Inositolösung (290 mOsm/kg) gewaschen, anschließend gut resuspendiert. Bei verschiedenen Leitfähigkeiten (10, 25, 40  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), eingestellt mit HEPES-KOH, pH 7,2) erfolgt die Bestimmung der charakteristischen Frequenz (Maximum) der Antifeldrotation mittels der Kompensationsmethode. Mit Hilfe einer linearen Regression der mit dem Zellradius normierten charakteristi-

schen Frequenzen, aufgetragen gegen die externe Leitfähigkeit, kann man die elektrischen Parameter (Kapazität und Leitfähigkeit) der Plasmamembran bestimmen. Die elektrischen Parameter der in Anwesenheit erfindungsgemäßer Alginate kultivierten Zellen bleiben unverändert, wohingegen die mit kommerziellen Alginaten kultivierten Zellen eine Zunahme der Membrankapazität um 10 bis 50 % aufweisen.

#### 8. Zellgröße und Zellzahl

Die Biokompatibilität der erfindungsgemäß gereinigten Alginat- te kann auch mit folgendem Test gezeigt werden. Lebende Zellen, wie Human-Lymphozyten oder Maus-Lymphozyten werden für einige Tage mit Alginaten in Kultur gehalten. Weisen die Alginat- te eine immunogene Wirkung auf, so vergrößern sich die Zellen und es erhöht sich die Anzahl der Zellen (um diesen Effekt zu verdeutlichen, können zusätzliche Stimulanzien, z.B. LPS oder PHA in die Kultur gegeben werden). Die Zellgröße und die Zellzahl kann mit Hilfe des CASY1 Cell Analyzer (Model TTC, Schärfe Technology, Reutlingen, Deutschland), der nach dem Coulter Prinzip arbeitet, ermittelt werden. Ein solches Gerät erlaubt die schnelle, genaue Erfassung (Größe, Größenverteilung und Zellzahl) mehrerer tausend Zellen pro Messung. Bei erfindungsgemäß gereinigten Alginaten läßt sich keine signifikante Zellvergrößerung und Erhöhung der Zellzahl nach Inkubation messen, wohingegen bei kommerziellen Alginaten eine deutliche Zellvergrößerung (rd. 50 %) und eine erhöhte Zellzahl (35 bis 50 %) nachweisbar ist.

Die Messungen wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt. Die Lymphozytensuspension ( $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml in Complete Growth Medium) wird mit einer Alginatlösung (Endkonzentration: 0,05%) versetzt und 3 Tage bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C kultiviert. Danach wird ein abzentrifugiertes und in Inosit (oder

PBS) aufgenommenes Aliquot (100 µl) der gut resuspendierten Lymphozytensuspension 2 x in isoosmolaler Inositollösung (290 mOsm/kg) gewaschen und in 10 ml PBS (phosphatgepufferte Saline) aufgenommen und sofort im CASY1 gemessen. Aus den CASY-Histogrammen kann der Anteil der großen, stimulierten Zellen an der Gesamtpopulation berechnet werden.

**PATENTANSPRÜCHE**

1. Verfahren zur Gewinnung einer hochgereinigten Alginatzusammensetzung, mit den Schritten:
  - Extrahieren von Algenmaterial oder Rohalginat in einer Lösung mit einem Komplexbildner,
  - Filtern der Lösung,
  - Ausfällen von Alginat aus der Lösung, und
  - Sammeln des gefällten Alginats.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem zum Extrahieren als Komplexbildner Ethylendiamentetraessigsäure verwendet wird.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem das Extrahieren in einer Sodalösung erfolgt.
4. Verfahren gemäß Anspruch 2 oder 3, bei dem zum Extrahieren der Lösung Aktivkohle zugesetzt wird.
5. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem vor dem Filtern der Lösung ein Sedimentieren von Zellbestandteilen und Partikeln mit einem porösen Bindemittel aus der Lösung erfolgt.
6. Verfahren gemäß Anspruch 5, bei dem das Sedimentieren mit einem porösen Granulat auf der Basis von Kieselgur, Zellulose oder Recycling-Materialien aus nachwachsenden Rohstoffen erfolgt.
7. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem das Filtern mit Tiefenfiltern jeweils abnehmender Porengröße erfolgt.



8. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem das Ausfällen von Alginat mit Ethanol erfolgt.

9. Verfahren gemäß Anspruch 6, bei dem der Ethanolgehalt im Bereich von 10-50 % gewählt ist.

10. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem das Sammeln des ausgefällten Alginats durch Aufschäumen aus der Lösung, durch Dekantieren der Lösung oder durch Rühren der Lösung mit einer Rühr- und Sammeleinrichtung erfolgt.

11. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem das Entwässern des Alginats bei Raumtemperatur erfolgt.

12. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem nach dem Entwässern das Extrahieren, Filtern, Fällen und Entwässern mindestens einmal wiederholt wird.

13. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem als Algenmaterial in der Natur vorkommende Algenfrischmaterial oder in einem Bioreaktor bzw. Tankanlage kultiviertes Algenfrischmaterial oder Algenmaterial aus fusionierten oder regenerierten Algenzellen oder kommerzielles Alginat verwendet wird.

14. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem als Algenmaterial bestimmte Organ- oder Gewebeteile von Algen oder Algenteile bzw. bestimmte Organ- oder Gewebeteile von Algen oder Algenteilen aus bestimmten Stadien des Entwicklungszyklus von Algen verwendet werden.

15. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem als Algenmaterial Braunalgen oder andere alginatproduzierende Süßwasser- oder Salzwasseralgen verwendet werden.

16. Alginatzusammensetzung, die als Mischpolymer aus Mannuronsäure und Guluronsäure besteht, **dadurch gekennzeichnet**, daß im Mischpolymer ein Verhältnis von Mannuronsäure zu Guluronsäure im Bereich von 1% bis 90% gegeben ist und das mittlere Molekulargewicht des Mischpolymers größer als 250 kD ist.
17. Alginatzusammensetzung, die in wässriger Lösung mit einer 0.1%-igen Konzentration eine Viskosität im Bereich von 10 bis 15 mPa · s besitzt.
18. Alginatzusammensetzung, die in wässriger Lösung mit einer 0.5%-igen Konzentration eine Viskosität von 250 bis 300 mPa · s besitzt.
19. Alginatzusammensetzung, die in wässriger Lösung bei Beleuchtung mit einer Anregungswellenlänge von 366 nm im Spektralbereich von 380 bis 550 nm keine Fluoreszenzemission zeigt.
20. Alginatzusammensetzung, die bei Farbtests mit der Folin-Denis-Reagenz oder mit Dimethoxybenzaldehyd keine Einfärbung zeigt.
21. Alginatzusammensetzung, die in wässriger Lösung bei Beleuchtung mit einer Anregungswellenlänge von 270 nm im Spektralbereich von 300 bis 500 nm keine Fluoreszenzemission zeigt.
22. Alginatzusammensetzung, die keine mit dem photometrischen Proteinnachweis nach Bradford nachweisbaren Proteine enthält.
23. Alginatzusammensetzung, die bei Implantation in die Nieren von BB/OK-Ratten keine signifikante immunologische Reaktion auslöst.

24. Alginatzusammensetzung, die nach Anwendung des XTT/MTT-Tests, oder der Zellrotationsmethode, oder einer elektrischen Zellzahl- und Zellgrößenbestimmung zu keiner nachweisbaren Lymphozytenaktivierung führt.

25. Alginatzusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 16 bis 24, die nach einem der Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15 hergestellt ist.

26. Verwendung einer Alginatzusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 16 bis 25 zur Herstellung von Alginatkapseln oder -umhüllungen für die Transplantationschirurgie und für andere medizinische Anwendungen und für die Lebensmittelindustrie.

27. Verwendung einer Alginatzusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 16 bis 25 zur Herstellung von Alginatkapseln oder -umhüllungen für allogene und xenogene Gewebe.

28. Verwendung einer Alginatzusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 16 bis 25 zur Herstellung von Alginatkapseln oder -umhüllungen für Langerhans'sche Inseln, Nebenschilddrüsengewebe, endokrines Gewebe oder dopamin-sezernierende Zellen.



1/2

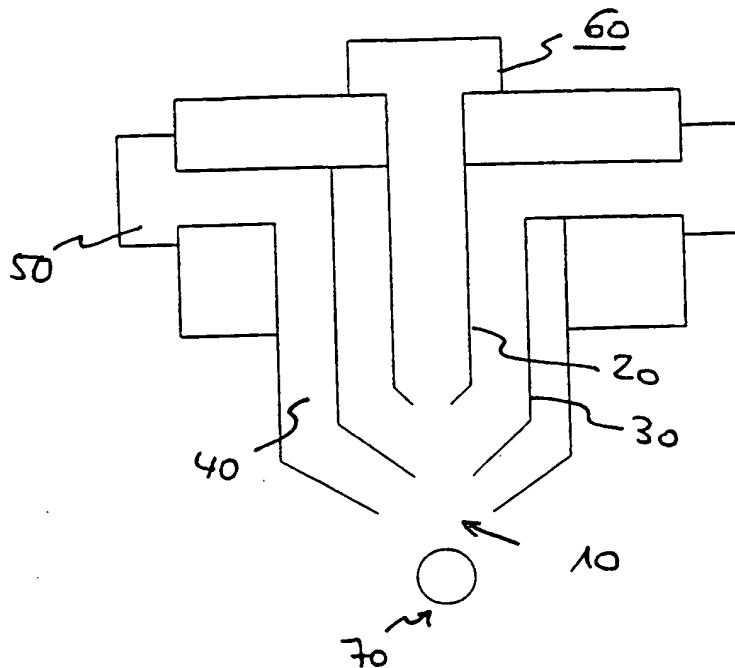
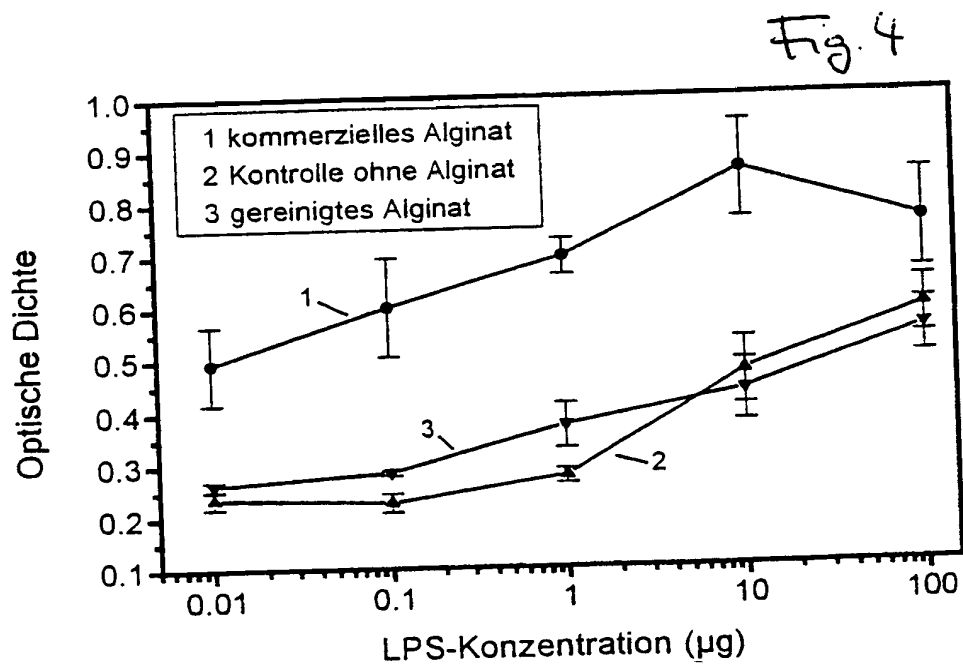


Fig. 1





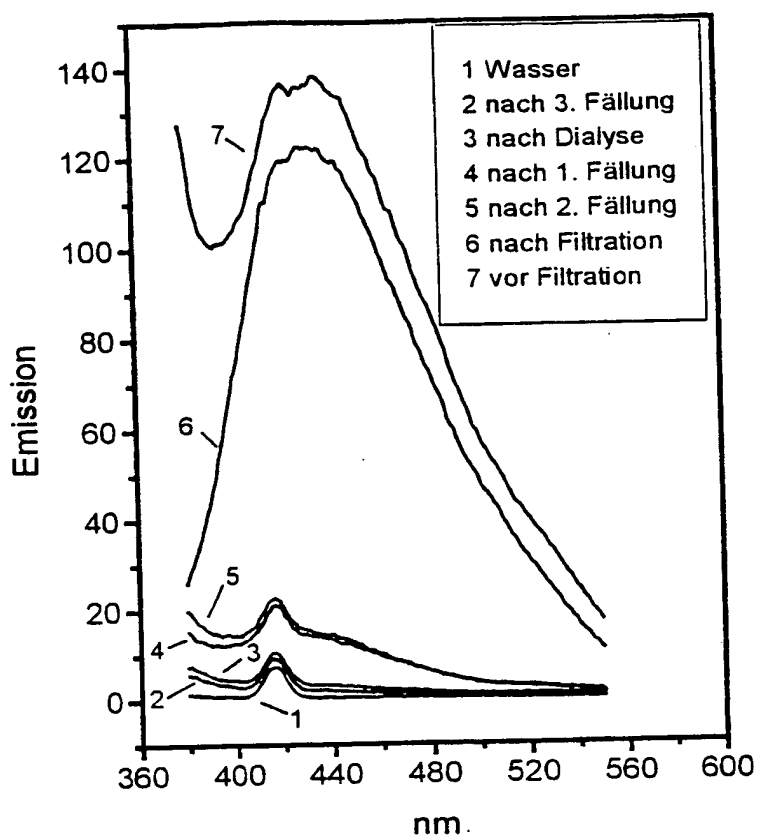


Fig. 2

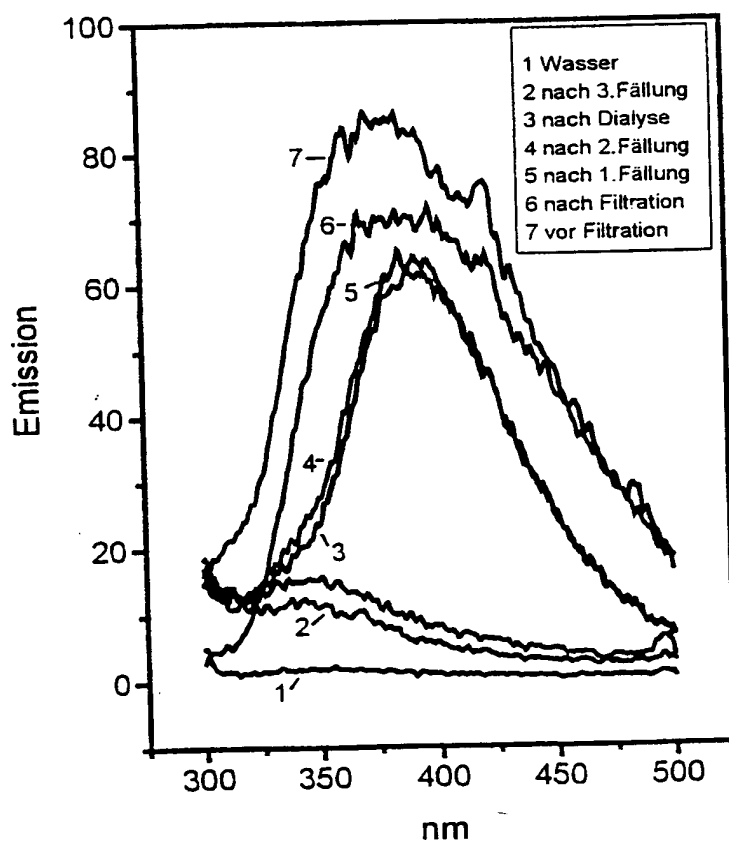


Fig. 3





# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PL/EP 99/05867

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 C08B37/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C08B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 93 24077 A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 9 December 1993 (1993-12-09) page 10, line 13 -page 11, line 26 ----	1-28
A	KLOCK G ET AL: "Biocompatibility of mannuronic acid-rich alginates" BIOMATERIALS,GB,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., BARKING, vol. 18, no. 10, page 707-713 XP004063784 ISSN: 0142-9612 ----	
A	WO 93 16111 A (ZIMMERMANN ULRICH) 19 August 1993 (1993-08-19) -----	

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

**Special categories of cited documents:**

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 November 1999

Date of mailing of the international search report

26/11/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Lensen, H

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/05867

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9324077 A	09-12-1993	US 5429821 A	04-07-1995
		AU 4409793 A	30-12-1993
		CA 2135770 A	12-09-1993
		EP 0642326 A	15-03-1995
		JP 7507550 T	24-08-1995
		US 5578314 A	26-11-1996
		US 5643594 A	01-07-1997
		US 5693514 A	02-12-1997
WO 9316111 A	19-08-1993	DE 4204012 A	19-08-1993
		AT 150469 T	15-04-1997
		DE 59305882 D	24-04-1997
		DK 626974 T	23-06-1997
		EP 0626974 A	07-12-1994
		ES 2101299 T	01-07-1997
		GR 3023797 T	30-09-1997
		JP 7503985 T	27-04-1995

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 C08B37/04

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C08B

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 93 24077 A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 9. Dezember 1993 (1993-12-09) Seite 10, Zeile 13 -Seite 11, Zeile 26 ---	1-28
A	KLOCK G ET AL: "Biocompatibility of mannuronic acid-rich alginates" BIOMATERIALS,GB,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., BARKING, Bd. 18, Nr. 10, Seite 707-713 XP004063784 ISSN: 0142-9612 ---	
A	WO 93 16111 A (ZIMMERMANN ULRICH) 19. August 1993 (1993-08-19) -----	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

11. November 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

26/11/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Lensen, H

# INTERNATIONALER RESEARCHBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/05867

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9324077 A	09-12-1993	US 5429821 A	04-07-1995
		AU 4409793 A	30-12-1993
		CA 2135770 A	12-09-1993
		EP 0642326 A	15-03-1995
		JP 7507550 T	24-08-1995
		US 5578314 A	26-11-1996
		US 5643594 A	01-07-1997
		US 5693514 A	02-12-1997
WO 9316111 A	19-08-1993	DE 4204012 A	19-08-1993
		AT 150469 T	15-04-1997
		DE 59305882 D	24-04-1997
		DK 626974 T	23-06-1997
		EP 0626974 A	07-12-1994
		ES 2101299 T	01-07-1997
		GR 3023797 T	30-09-1997
		JP 7503985 T	27-04-1995

Verfahren zur Gewinnung hochgereinigter Alginat

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung hochgereinigter Alginat, insbesondere aus Braunalgen, und mit diesem Verfahren hergestellte Alginat mit einem hohen Polymerisationsgrad sowie deren Verwendung.

Alginat besitzen zahlreiche Anwendungen im Bereich der Lebensmitteltechnik (z.B. Askar in "Alimenta", Bd. 21, 1982, S. 165 ff.) und in der Textiltechnik, in zunehmendem Maße jedoch auch in der Pharmazie, Medizin, Biochemie und Biotechnologie. Die nach den bisher bekannten Verfahren aus Algenpflanzen gewonnenen Alginat (Übersicht beispielsweise in D.J. McHugh: "Production and Utilization of Products from Commercial Seaweeds" in "FAO Fisheries Technical Papers", Bd. 288, 1987, Chap. 2) sind durch Schwankungen der Zusammensetzung und der Struktur sowie durch Verunreinigungen gekennzeichnet. Dies ergibt sich daraus, daß das Rohalginat aus Biomasse extrahiert wird, die aus Wildpopulationen gewonnen wird. Die insbesondere in Küstengewässern wachsenden Algenpopulationen sind zahlreichen geographischen, saisonalen und stofflichen (Umweltverschmutzung) Einflüssen ausgesetzt. Hinzu kommt, daß bei der Ernte die Algen ggf. gemeinsam mit Fremdstoffen eingesammelt und zur Konservierung bzw. zur Entfärbung einer chemischen Behandlung (z.B. mit Formalin und/oder Hypochlorid) unterzogen werden.

Die bis jetzt verfügbaren Rohalginat sind daher Mischpolymere variabler Struktur mit Verunreinigungen, zu denen insbesondere toxische Chemikalien zählen können. Da in der Lebensmittel- und Textiltechnik vorrangig Interesse an den gelbildenden Eigenschaften der Alginat besteht, wurden Verfahren



zur Nachreinigung oder Reinigung der Rohalginatate, wie sie im folgenden erläutert werden, erst für die biologisch-medizinischen Anwendungen entwickelt.

Verfahren zur Reinigung von Alginaten (wie sie z.B. von den Unternehmen Keltone LV oder Kelco Nutrasweet verfügbar sind) werden beispielsweise in DE-OS 4 204 012, US-A 5 429 821 (bzw. US-A 5 656 468) und in der Publikation von P. De Vos et al. in "Diabetologia" (Bd. 40, 1997, S. 262 ff.) beschrieben. Diese Verfahren besitzen generell die Nachteile eines hohen Energieaufwandes (Anwendungen einer Elektrophorese, Gefrier-trocknung oder Zentrifugation, Erhitzung oder Kochen), einer hohen Umweltbelastung (Verwendung von Säuren wie HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, biologisch nicht-abbaubaren Lösungsmitteln wie CHCl<sub>3</sub> oder Schwermetallionen wie beispielsweise Barium, Blei oder Kadmi-um) und einer Beschränkung des erzielbaren mittleren Moleku-largewichts des gereinigten Endmaterials. Weitere Nachteile der herkömmlichen Verfahren ergeben sich im einzelnen aus den folgenden Erläuterungen:

Bei dem aus DE-OS 42 04 012 bekannten Verfahren wird eine Rohalginatlösung einer Behandlung mit einem Komplexbildner, einer Säureextraktion bei hohen Temperaturen (rund 70 °C), einer Waschung, einer Behandlung mit konzentriertem Alkohol (rund 80 %) und einer weiteren Behandlung mit einem Komplex-bildner ausgesetzt. Anschließend folgt ein Dialysevorgang und eine Gefriertrocknung (oder Elektrophorese oder Zentrifugati-on) zur Gewinnung des gereinigten Alginats. Dieses Verfahren ist wegen des hohen Energieaufwands, der großen Anzahl von Verfahrensschritten, dem Einsatz von toxischen Materialien (z.B. Barium als Komplexbildner) und der Beschränkung auf Alginat (< 500 kD) nachteilig. Ein besonderes Problem ist jedoch, daß der Reinigungseffekt dieses Verfahrens nur be-schränkt ist.





In DE-OS 42 04 012 werden die gereinigten Alginatate zwar als mitogenfreie Substanzen benannt, dies jedoch lediglich unter der Annahme einer Mitogenfreiheit, falls in vorbestimmten Tierversuchen keine Entzündungsreaktionen beobachtet werden, sowie einer Unbedenklichkeit weiterer Komponenten, die im hochgereinigten Alginat verblieben. Es hat sich jedoch gezeigt, daß die am Ende der 80er Jahre entwickelten und in DE-OS 42 04 012 implementierten Tierversuche nicht geeignet sind, eine Mitogenfreiheit nachzuweisen, die den Anforderungen der modernen biomedizinischen Anwendungen, z.B. der Implantationstechnik, erfüllt. So wurden die Tierversuche beim herkömmlichen Reinigungsverfahren mit sogenannten Lewis-Ratten durchgeführt. Inzwischen konnte jedoch durch G. Klöck et al. in "Biomaterials" (Bd. 18, 1997, S. 707ff) und durch P. Gröhn (Dissertation Universität Würzburg, 1998) nachgewiesen werden, daß die Lewis-Ratten eine relativ geringe Empfindlichkeit gegenüber mitogenen Substanzen besitzen. Implantierte Alginat-Kapseln, die bei Lewis-Ratten nach drei Wochen keine Entzündungsreaktionen auslösten, führten beispielsweise bei sogenannten BB-OK-Ratten ("Bio Breeding / Ottawa Karlsburg") zu Entzündungsreaktionen. Daraus ergibt sich, daß die aus DE-OS 42 04 012 bekannten mitogenfreien Substanzen tatsächlich nicht als hochgereinigt betrachtet werden können und wegen verminderter Biokompatibilität bei biomedizinischen Anwendungen nur beschränkt einsetzbar sind.

Bei dem aus US-A 5,429,821 bzw. US-A 5,656,468 bekannten Reinigungsverfahren wird ebenfalls eine Säurefällung durchgeführt. Es sind wiederum Hochtemperaturverfahrensschritte und zur endgültigen Alginatgewinnung eine Zentrifugation, Elektrophorese oder Gefriertrocknung erforderlich. Die nach diesem Verfahren gewonnenen Alginatate sind auf Molekulargewichte unterhalb 200 kD beschränkt. Es folgt eine Trocknung bei 80°C, bei der im Mischpolymer Trocknungsartefakte durch Struktur- oder Stoffumsetzungen entstehen können.



Ein besonderes Problem stellt die Beschränkung auf relativ geringe Molekulargewichte dar. So ist beispielsweise aus "Immobilized Enzymes" von J. Chibata (A Halsted Press Book, John Wiley & Sons, 1978) bekannt, daß die Bio-Toxizität von Materialien mit der Zunahme des Molekulargewichts abnimmt.

Schließlich ist auch das oben genannte Verfahren nach P. de Vos et al. durch zahlreiche Verfahrensschritte, einschließlich einer Säurefällung, dem Einsatz toxischer Chemikalien (Chloroform), die Verwendung hochkonzentrierten Ethanol (rund 70%) und die Anwendung einer Zentrifugation, Elektrophorese oder Gefriertrocknung gekennzeichnet.

Ein weiterer Nachteil sämtlicher Reinigungsverfahren besteht in deren Beschränkung auf die Reinigung kommerziell verfügbarer Rohalginat. Die Verfahren sind nicht auf Frischmaterial oder geerntete Biomasse anwendbar. Außerdem sind die Verfahren aufgrund der umständlichen Verfahrensführung, des Energieaufwands und dem Einsatz toxischer Chemikalien für eine großtechnische Anwendung nicht praktikabel.

Die Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren zur Gewinnung hochgereinigter Alginat anzugeben, mit dem die Nachteile herkömmlicher Reinigungsverfahren vermieden werden und die Herstellung eines hochgereinigten Alginats, insbesondere in großtechnischem Maßstab, ermöglicht wird. Die Aufgabe der Erfindung ist es auch, ein neuartiges Alginat, insbesondere mit einem gegenüber den herkömmlichen Alginaten erhöhten Molekulargewicht, bzw. einer erhöhten Viskosität, anzugeben.

Diese Aufgabe wird durch ein Verfahren bzw. eine Alginatzusammensetzung mit den Merkmalen gemäß den Patentansprüchen 1 bzw. 16 gelöst. Vorteilhafte Ausführungsformen und Verwendungen der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.



Unter einem hochgereinigten Alginat wird hier eine reproduzierbar herstellbare Alginatzusammensetzung verstanden, die vorbestimmte Molekulargewicht- und/oder Viskositätsparameter besitzt und eine hohe Sterilität, Reinheit und Biokompatibilität aufweist. Letzteres Merkmal bezieht sich beispielsweise darauf, daß mit erfindungsgemäß hochgereinigten Alginaten in autoimmundiabetischen BB/OK-Ratten auch nach mehrwöchiger Implantation keine oder eine vernachlässigbar geringe Fremdkörperreaktion ausgelöst wird.

Im Unterschied zu den herkömmlichen Reinigungsverfahren, die sämtlich an kommerziell verfügbare Rohalginat angepaßt sind, die jedoch Verschnitte oder Mischungen aus verschiedenen Algenmaterialien unter Einschluß von tierischen oder anderen Fremdmaterialien darstellen und somit grundsätzlich nicht hochgereinigtes Alginat ergeben können, wird erfindungsgemäß eine Alginatherstellung oder -gewinnung angegeben, die vorzugsweise von sauberem Algenfrischmaterial oder getrocknetem Algenmaterial als Ausgangsstoff ausgeht. Es ist insbesondere vorgesehen, daß zunächst das Algenmaterial in Gegenwart von Komplexbildnern behandelt wird, worauf mit einem Bindemittel in Form eines Granulats oder einem vergleichbaren porösen Material Zellbestandteile und Partikel sedimentiert werden. Nach einer Filtration erfolgt ein Fällungsschritt, vorzugsweise unter gleichzeitigem Einblasen eines Trägergases, unter dessen Wirkung das ausgefällte Alginat auf der Lösung aufschwimmt. Dieses Aufschäumen (Floatieren) ist nicht zwingend erforderlich. Ausgefälltes Alginat kann auch anderweitig aus der Lösung getrennt werden (z.B. durch einen Dekantiervorgang). Das derart gewonnene Alginat kann von der Lösungsoberfläche abgenommen oder als Rückstand nach dem Dekantieren aufgenommen und an Luft oder mit einer Filterpresse entwässert werden. Je nach Anwendungsfall wird dieser Reinigungsvorgang bzw. Teilschritte dieses Reinigungsvorgangs einmalig



oder mehrmals durchgeführt. Nach der letzten Reinigung erfolgt ein abschließendes Waschen und Lufttrocknen.

Diese Verfahrensweise besitzt die folgenden Vorteile. Bei der Alginatgewinnung wird vollständig auf toxische Chemikalien und Hochtemperaturbedingungen verzichtet. Die einzelnen Verfahrensschritte basieren auf an sich bekannten und einfach beherrschbaren Techniken, deren erfindungsgemäße Kombination besonders vorteilhaft in Bezug auf die Verfahrenskosten, den Materialaufwand und die Prozeßgeschwindigkeit ist. Es wird erstmalig im Gegensatz zu allen herkömmlichen Reinigungsversuchen eine Biokompatibilität des gewonnenen Alginatmaterials erreicht, so daß sich dessen Anwendungsgebiet erheblich, insbesondere in der Biologie und Medizin, erweitert. Das erfindungsgemäß hergestellte, biokompatible Produkt basiert ausschließlich auf Alginat. Das Alginat ist frei von Zusatzstoffen, wie z. B. Immunsuppressiva oder immunstimulierenden Substanzen oder Phenolen oder Phenol-ähnlichen Verbindungen, und kann in diesem Zustand unmittelbar angewendet werden.

Die Verfahrensschritte können ohne Probleme in verhältnismäßig kleinem Maßstab, z.B. am Ort der Algenernte, oder auch großtechnisch durchgeführt werden. Durch gezielte Steuerung der Fällungsreaktion werden Verunreinigungen durch Fucoidan ausgeschlossen, so daß sich die Reinheit des gewonnenen Alginats im Vergleich mit herkömmlichen Alginaten verbessert.

Die unmittelbare Verarbeitung von Algenmaterial besitzt eine Reihe von Vorteilen. Erstens werden Nachteile bei der herkömmlichen Algenernte, die sich durch Zersetzung und Verrottung am Ernteort und die konservierende Chemikalienbehandlung ergeben, vollständig vermeidbar. Zweitens lassen sich die geernteten Algen nach Organen oder Gewebeabschnitten trennen, bevor die Alginatgewinnung durchgeführt wird. Da sich die verschiedenen Algengewebe durch verschiedene Verhältnisse der





monomeren Mannuronsäure und Guluronsäure unterscheiden, können gezielt hochgereinigte Alginat mit einer bestimmten Mannuron-Guluron-Zusammensetzung hergestellt werden. Entsprechendes gilt für die Wahl bestimmter Gewebeteile zur Erzielung eines bestimmten Molekulargewichts. Es lassen sich erfindungsgemäße Alginatzusammensetzungen mit einem Molekulargewicht von mehr als 1.000 kD gewinnen. Schließlich kommt das erfindungsgemäße Verfahren ohne aufwendige Zentrifugations-schritte aus, wodurch die praktische Implementierung weiter vereinfacht wird. Die gezielte Gewinnung verschiedener Sorten hochreinen Alginats (z.B. guluronat- bzw. mannuronatreiches Alginat) läßt sich auch durch gezielte Gewinnung aus bestimmten Algenspezies (*Laminariales*, *Ectocarpales*, *Fucales* und anderen Alginat enthaltenden Algenspezies) realisieren, die sich durch die chemische Struktur des jeweiligen Alginats unterscheiden. Bei der organspezifischen Selektion werden hingegen Phylloide, Cauloide und Rhizoide der Algen getrennt und separat verarbeitet. Diese Differenzierung kann weiter verfeinert werden, in dem einzelne Gewebe der verschiedenen Organe getrennt und das Alginat aus diesen Geweben separat gewonnen wird.

Die Erfindung ist insbesondere zur Alginatgewinnung aus frischem oder getrockneten Algenmaterial (insbesondere Braunalgen) angepaßt. Es ist jedoch auch möglich, mit dem erfindungsgemäß Verfahren kommerziell verfügbare Rohalginat zu reinigen oder das erfindungsgemäß Verfahren mit bestimmten Wasch- oder Trennschritten (z.B. Zentrifugation) zu kombinieren, die aus den herkömmlichen Reinigungsverfahren bekannt sind.

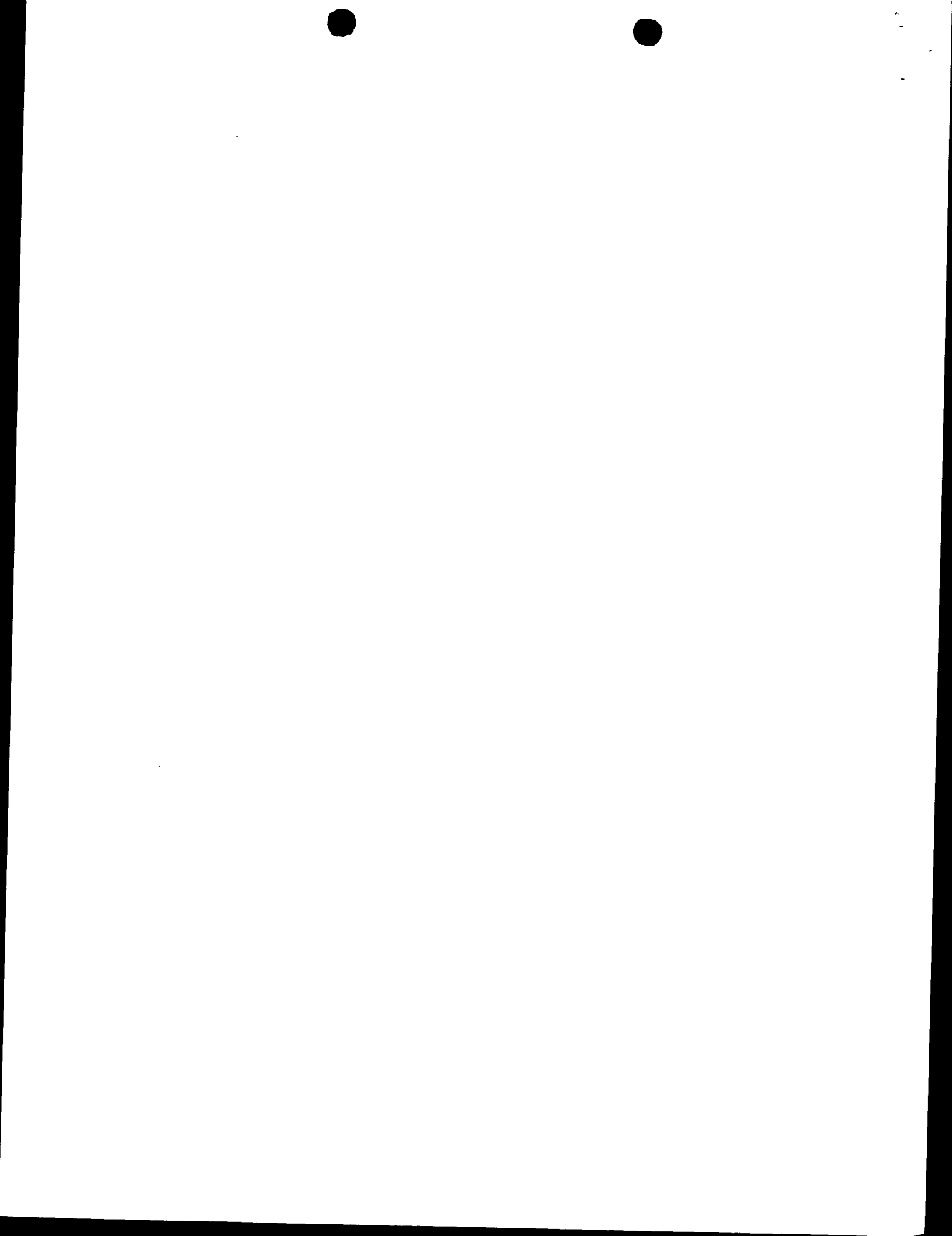
Vorteile der Erfindung ergeben sich auch daraus, daß das hochreine Alginat unmittelbar aus den Algenpflanzen unter Kontrolle sämtlicher Prozeßschritte gewonnen wird. Es werden toxische Chemikalien (insbesondere Lösungsmittel) vermieden,



so daß ein Einsatz für pharmazeutische Zwecke ohne weiteres möglich ist. Das Aufschäumen des ausgefällten Alginats stellt ein besonders einfaches und energiearmes Abtrennverfahren dar.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden die folgenden Verfahrensschritte zunächst an Algenfrischmaterial oder getrocknetem Material durchgeführt und anschließend an hochgereinigtem Alginat teilweise wiederholt, das beim ersten oder früheren Verfahrensabläufen gewonnen wurde. Das Algenmaterial bzw. kommerzielle Alginat wird im folgenden als Ausgangsmaterial bezeichnet.

Erfindungsgemäß wird das Ausgangsmaterial zunächst in Gegenwart von Komplexbildnern, ggf. in einer Sodalösung (siehe unten, Beispiel 1), extrahiert. Anschließend werden in der Lösung vorhandene Zellbestandteile und Partikel durch Zugabe eines Granulats und falls erforderlich durch Zugabe von Ionenaustauschern (wie z.B. Amberlit) zur Sedimentation gebracht und die Lösung anschließend gefiltert. Die Sedimentation kann alternativ unter Verwendung von Elektrographit (z.B. in Kügelchen-Form) vorgenommen werden. Dabei wird Elektrographit in die Lösung eingerührt und durch einen Stromfluß zwischen zwei in die Lösung eingehängten Elektroden aufgeladen. Die geladenen Elektrographitkügelchen zeigen eine Akkumulation von Verunreinigungen, die hier die betreffenden Zellbestandteile und Fremdpartikel umfassen. Die Sedimentation wird vorzugsweise bei der Reinigung kommerziellen Alginatmaterials eingesetzt, kann aber anwendungsabhängig auch ganz wegfallen (siehe unten, Beispiel 2). Der Filterschritt kann eine mehrfache Filterung mit schrittweise sich verringernder Porengröße z.B. von 15  $\mu\text{m}$  bis 0.1  $\mu\text{m}$  umfassen. Aus der gefilterten Lösung wird das Alginat durch ein geeignetes Fällungsmittel ausgefällt. Die Fällung wird vorzugsweise mit einem Alkohol (z.B. Ethanol) durchgeführt. Es kann aber auch



eine Säure oder ein anderes geeignetes Fällungsmittel verwendet werden. Die Alkoholkonzentration wird im Bereich zwischen 10% bis 50%, vorzugsweise im Bereich von 30% bis rd. 50% gewählt. In diesem Konzentrationsbereich bleiben Verunreinigungen durch immunologisch aktive Polysaccharide wie z.B. Fucoindan in der Lösung und können somit vom Alginat getrennt werden. Falls höhere Alkoholkonzentrationen wie z.B. beim Verfahren nach De Vos et al. verwendet werden, so können diese unerwünschten Polysaccharide nicht abgetrennt werden. Während der Ausfällung erfolgt vorzugsweise eine Durchströmung der Lösung mit einem Treibgas (z.B. Luft). Das ausgefällte Alginat wird durch die eingeblasene Luft nach oben aufgetrieben und kann von der Lösungsoberfläche leicht mit einer geeigneten Einrichtung (z.B. Netz, Sieb oder dergl.) von der Lösung abgetrennt werden. Anschließend wird das gesammelte Alginat mit einer Filterpresse entwässert.

Die genannten Verfahrensschritte werden anwendungsabhängig ganz, teilweise oder in teilweise modifizierter Form wiederholt. Nach dem letzten Verfahrensablauf wird das hochgereinigte Alginat in Ethanol und ggf. anschließend in Wasser gewaschen und bei Raumtemperatur luftgetrocknet.

Das gereinigte Alginat besitzt in Abhängigkeit vom Ausgangsmaterial ein Verhältnis der Monomeren Mannuronsäure und Guronsäure im Bereich von 0.1 - 9 (entsprechend 1% bis 90% Mannuronsäure) und ein mittleres Molekulargewicht von ca. 10 kD bis mehr als 1000 kD. Derart gereinigtes, bei einer autoimmundiabetischen BB/OK Ratte implantiertes Alginat löst nach einer Implantationszeit von 3 Wochen keine oder nur eine sehr schwache Fremdkörperreaktion aus, wie im einzelnen unten erläutert wird.

Das beschriebene Verfahren zur Alginatgewinnung kann in Bezug auf das Fällungsmittel, die Wahl des Sedimentationsmittels,

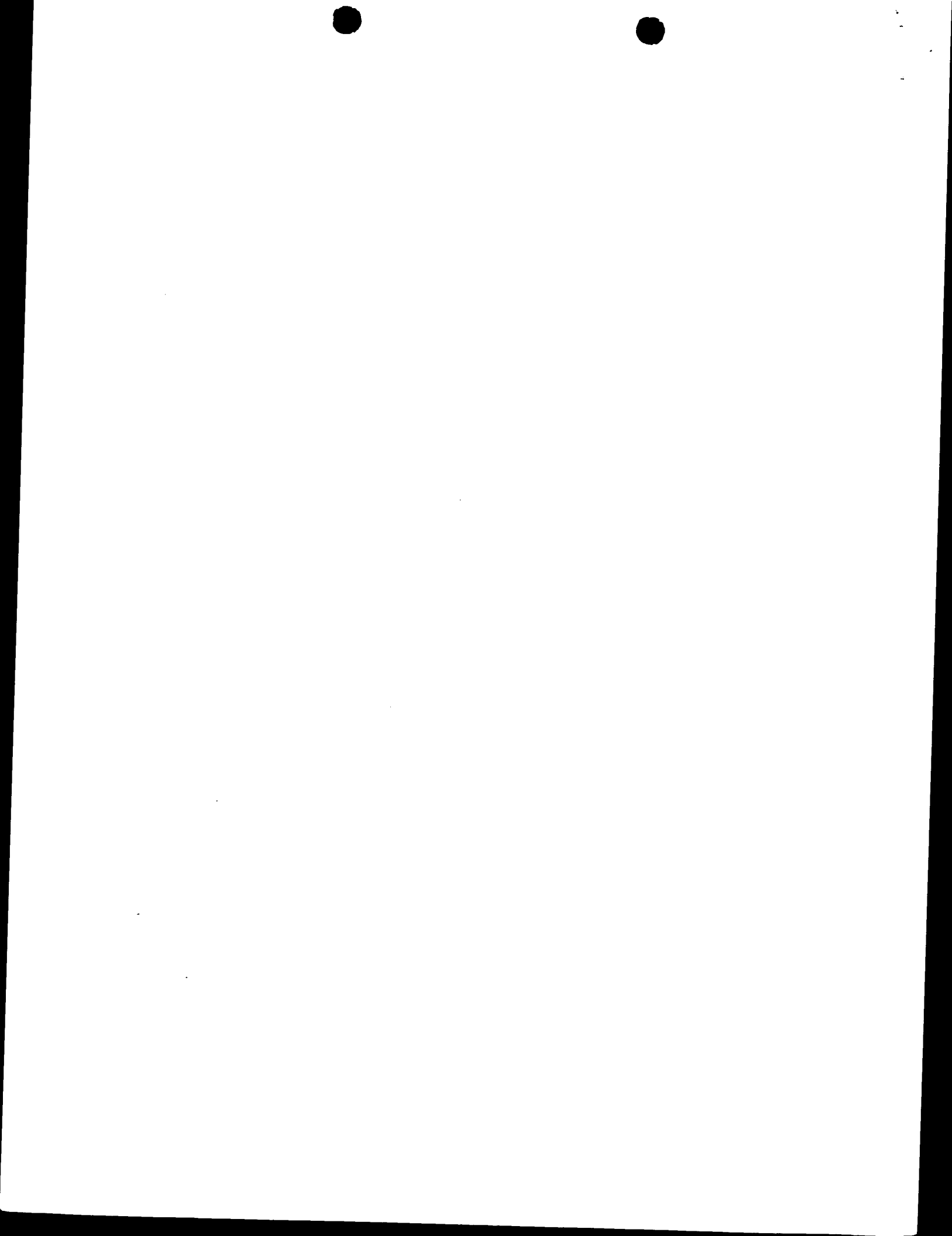


die Wahl des inerten Treibgases, das Fällungsverfahren und/oder das Vorgehen beim Einsammeln des ausgefällten Alginats modifiziert werden. Anstelle des zur Sedimentation eingesetzten Kieselgur kann auch jedes andere absorbierende Material wie Elektrographite, Granulate, Cellulose, poröse Recycling-Materialien in Pulver- oder Partikelform verwendet werden. Es ist auch möglich, zur Sedimentation ein mit einem absorbierenden Material beschichtetes Rührwerkzeug zu verwenden.

Gegenstand der Erfindung ist auch ein hochgereinigtes Alginat, das als Mischpolymer aus Mannuronsäure und Guluronsäure in einem Verhältnis im Bereich von 1% bis 90%, insbesondere rd. 70%, besteht, wobei das mittlere Molekulargewicht größer als 1000 kD, mindestens jedoch größer als 250 kD, ist.

Erfindungsgemäße Alginatate zeichnen sich aufgrund ihrer extremen Reinheit und aufgrund der schonenden Extraktion beim erfindungsgemäßen Verfahren durch charakteristische Stoffeigenschaften aus, die bei herkömmlichen Alginaten nicht gegeben sind. Diese Stoffeigenschaften umfassen sowohl charakteristische Parameter, die als Eigenschaften des Alginats direkt meßbar sind (z.B. Viskosität), als auch Parameter, die als Eigenschaften der erfindungsgemäß entfernten Verunreinigungen, deren vollständiges Fehlen oder vernachlässigbar geringes Auftreten auf die hohe Reinheit des erfindungsgemäßen Alginats hinweisen (z.B. Fluoreszenzeigenschaften von Verunreinigungen, Auslösung immunologischer Reaktionen bei Tierversuchen und in Zellkulturen etc.)

Ein erfindungsgemäßes Alginat zeichnet sich durch eine hohe Viskosität aus. Eine wässrige Lösung eines erfindungsgemäßen Alginats mit einer 0.1-%igen Konzentration besitzt eine Viskosität im Bereich von 10 bis 15 mPa s. Dies stellt einen erheblich höheren Wert gegenüber der Viskosität herkömmlicher





Alginatlösungen gleicher Konzentration (rd. 1 bis 5 mPa s) dar. Bei 0.5%igen Lösungen erfindungsgemäßer Alginatate ergibt sich eine Viskosität von 280 mPa s. Die Viskosität der Alginatlösungen werden mit einem Kugelrollviskosimeter (Typ: AMV-200, Anton Paar KG, Graz, Österreich) bestimmt. Aus den Viskositätswerten wird mittels der Verfahren nach Huggins ("J. Am. Chem. Soc.", Bd. 64, 1942, S. 2716 ff.) und Krämer ("Ind. Eng. Chem.", Bd. 30, 1938, S. 1200 ff.) das Molekulargewicht bestimmt. Es ergeben sich bei den erfindungsgemäßen Alginaten mittlere Molekulargewichte größer als 250 kD.

Erfindungsgemäße Alginatate sind frei von Phenolen und phenolähnlichen Verbindungen, insbesondere von Polyphenolen, die sich aus Phloroglucinol zusammensetzen, und Phenol-Protein-Verbindungen. Bei einer Anregungswellenlänge von 366 nm besitzen erfindungsgemäße Alginatate, abgesehen von einer Lösungsmittelfluoreszenz (Raman-Bande des Wassers) bei 418 nm im Spektralbereich von 380 bis 550 nm keine Fluoreszenzemissionen. Die Phenol- und Polyphenol-Freiheit erfindungsgemäßer Alginatate ergibt sich auch aus Farbttests unter Verwendung der Folin-Denis-Reaganz oder mit Dimethoxybenzaldehyd (DMBA). Erfindungsgemäße Alginatate besitzen bei diesen Farbttests, abgesehen von der Lösungsmittelabsorption, keine Extinktion.

Erfindungsgemäße Alginatate sind praktisch frei von Substanzen (z.B. Proteinen), die bei einer Wellenlänge von 350 nm absorbieren. Die Proteinfreiheit zeigt sich wiederum bei einer Fluoreszenzmessung mit einer Anregungswellenlänge von 270 nm, die, abgesehen von der Lösungsmittelfluoreszenz, im Spektralbereich von 300 bis 500 nm keine Fluoreszenzemission ergibt. Die Proteinfreiheit erfindungsgemäßer Alginatate wird auch mit dem photometrischen Proteinnachweis nach Bradford ("Anal. Biochem.", Bd. 72, 1976, S. 248 ff.) gezeigt.



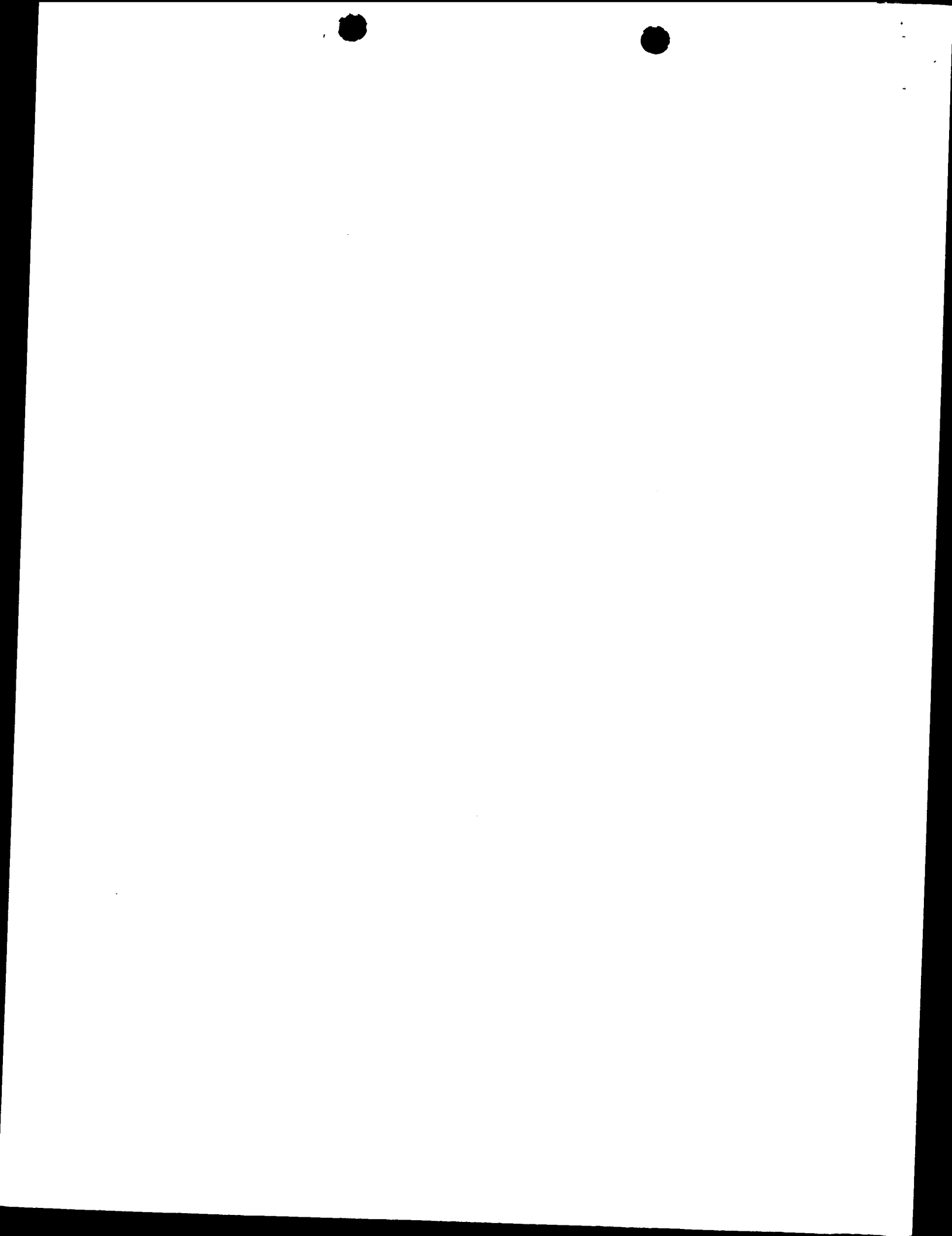
Erfindungsgemäße Alginatate sind auch Endotoxin-frei. Endotoxine sind Verunreinigungen, die bei einer Implantation einer Immunreaktionreaktion des Empfängers auslösen können, welche aus den Zellenwänden der bakteriellen Begleitflora der Alginatate in herkömmliche Algenextrakte gelangen. Erfindungsgemäße Alginatlösungen (Konzentration: 0,25%) besitzen einen Endotoxingehalt von weniger als 14,5 Endotoxineinheiten pro Milliliter Alginatlösung (Meßverfahren: quantitative Endotoxinbestimmung mit Limulus Amöbozyten Lysat-Test).

Erfindungsgemäße Alginatate sind im Gegensatz zu herkömmlichen Alginatextrakten biokompatibel, soweit dies durch die unten erläuterten XTT- und MTT-Tests und Versuche an BB/OK-Ratten gezeigt wird.

Bevorzugte Anwendungen eines derartigen, hochgereinigten Alginats sind die Transplantationschirurgie, bei der lebende Zellen in einer Alginatkapsel eingeschlossen und ohne die Auslösung immunologischer Reaktionen im Körper eines Lebewesens implantiert werden. Das hochgereinigte Alginat kann auch in den Gebieten der Lebensmittel- oder Textiltechnik zur Erhöhung der Verträglichkeit bestimmter Nahrungsmittel oder Stoffe eingesetzt werden. Es wird betont, daß das oben erläuterte erfindungsgemäße Verfahren auch zur Herstellung hochgereinigten Alginats mit geringerem Molekulargewicht bis zu 1000 kD geeignet ist.

Weitere Vorteile und Einzelheiten der Erfindung werden im folgenden, insbesondere unter Bezug auf die beigefügten Figuren beschrieben. Es zeigen:

Fig. 1                    eine Schnittansicht eines Düsenkopfes zur Herstellung von Alginatkapseln,



- Fig. 2      Fluoreszenzspektren zur Demonstration der Phenolfreiheit erfindungsgemäßer Alginat,
- Fig. 3      Fluoreszenzspektren zur Demonstration der Proteinfreiheit erfindungsgemäßer Alginat, und
- Fig. 4      Ergebnisse eines Lymphozytenstimulationstests zur Demonstration der Immunogenfreiheit erfindungsgemäßer Alginat.

#### Ausführungsbeispiele

Im folgenden werden konkrete Ausgestaltungen der oben allgemein erläuterten Verfahrensweise an Beispielen beschrieben. Dabei wird ohne Beschränkung auf die Reinigung bzw. Verwendung von Alginatmaterial auf der Basis von Braunalgen Bezug genommen. Anstelle von Braunalgen können allgemein alle alginatenthaltenden Salzwasser- oder Süßwasser-Algen verwendet werden. Die Reinigung von Alginatmaterial aus anderen Algen erfolgt in entsprechender Weise.

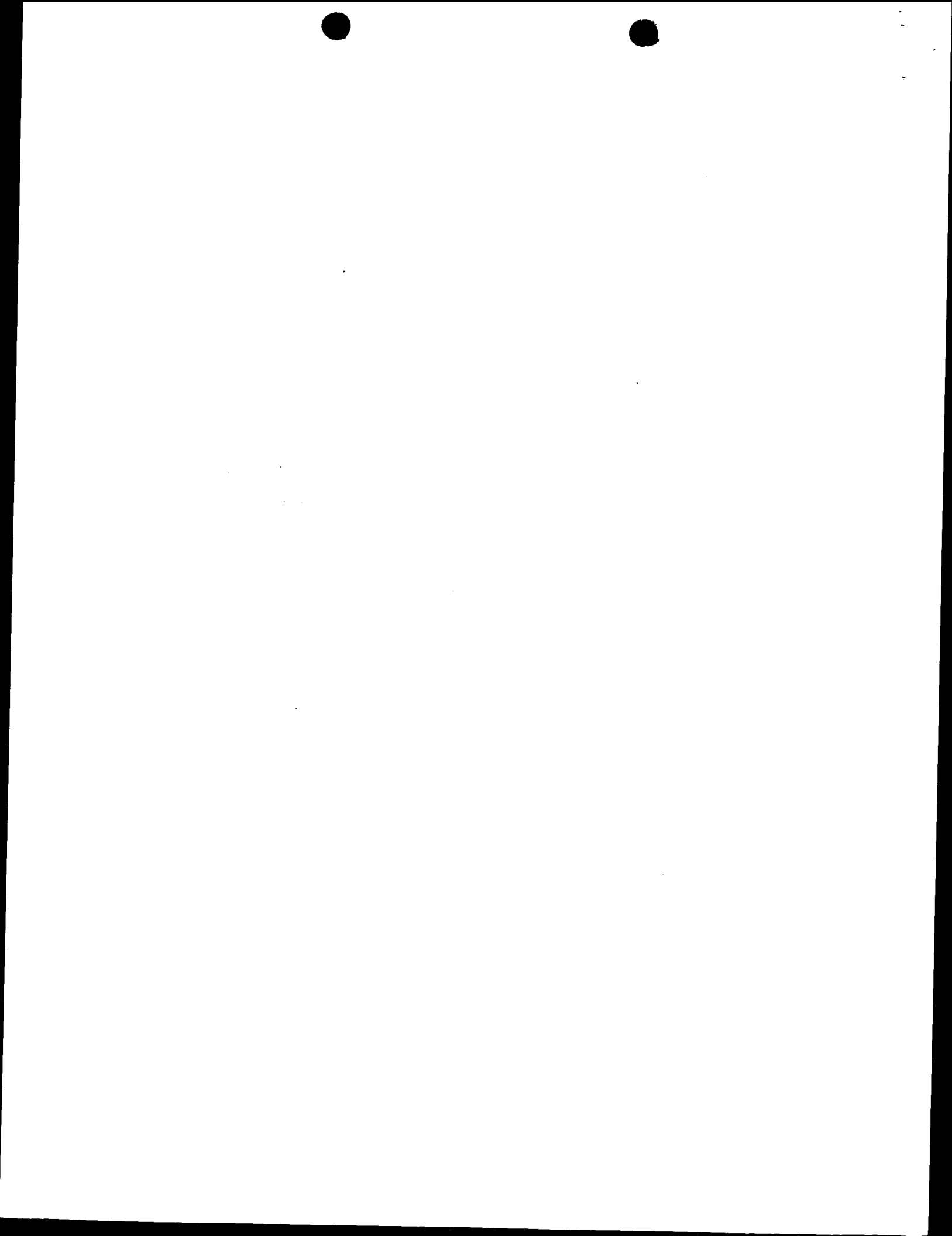
Das Ausgangsmaterial umfaßt (1) frische Braunalgen, (2) getrocknete Braunalgen oder (3) kommerzielles Alginat. Als Frischmaterial (1) werden in der Natur oder in einem Kultivierungsraum oder Gewächshaus geerntete Braunalgen oder Braunalgenteile aus vorbestimmten Entwicklungsstadien des Lebenszyklus der Algen oder entsprechendes in einem homogenen Bioreaktor kultiviertes Algenmaterial verwendet. Das Trockenmaterial (2) besteht aus getrockneten Braunalgen, die entsprechend diesen Alternativen gewonnen wurden.



### Beispiel 1

Beim ersten Beispiel wird auf 80 g trockene und anschließend wieder hydratisierte (gewässerte) Algen Bezug genommen. Bei kommerziellem Alginat, dessen Trockengewicht nur rund 1% des Frischgewichts ausmacht, wird entsprechend weniger Trockengewicht eingesetzt. Das trockene Material (z.B. *Laminariales*, *Fucales*) gemäß (2) oder (3) wird je nach Ausgangsmenge für mehrere Stunden in warmem Leitungswasser gewässert. Dies kann beispielsweise bei Leitungswasser mit einer Temperatur von 40°C mindestens 3 bis 4 Stunden dauern, wobei das Wasser mehrfach ausgetauscht wird oder fließt. Bei Verwendung von kälterem Wasser muß die Wässerung entsprechend verlängert werden. Die Wässerung erfolgt vorzugsweise dadurch, daß das Material in einem wasserdurchlässigen Behältnis (z.B. wasserdurchlässiger Sack) in fließendes Leitungswasser gehängt wird. Bei Wässerung in stehendem Wasser wird das Material z. B. bei einem Ausgangstrockengewicht von rund 80 g getrockneter Algen (entsprechend 10% des Frischgewichts von rund 800 g) in 3 bis 6 l Wasser gewässert. Nach der Wässerung erfolgt die Verfahrensweise für alle drei genannten Arten von Ausgangsmaterial (1) bis (3) analog.

Das Material wird in rund 5.7 l einer 25 mM EDTA-Lösung (Aqua dest. bzw. demineralisiertes Wasser) suspendiert (bzw. im Falle von kommerziellem Alginat (3) gelöst). Die Einwirkung der Ethylendiamintetraessigsäure(EDTA)-Lösung erfolgt mindestens 10 Stunden. Die Einwirkungszeit kann verkürzt werden, wenn die Suspension laufend gerührt wird. Mit steigender Einwirkungszeit verbessert sich die Ausbeute an gereinigtem Alginat. Bei einer ungerührten Suspension kann beispielsweise eine Einwirkungszeit von mehreren Tagen vorgesehen sein.





Anschließend werden 5%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  und EDTA als Festsubstanzen unter Rühren zugegeben. Die EDTA-Menge wird derart gewählt, daß eine 50 mM-EDTA-Lösung gebildet wird. Die Suspension wird solange gerührt, bis eine homogene (feindisperse) Lösung vorliegt. Dieser Zustand ist insbesondere dann erreicht, wenn in der Lösung nur noch wenige Zellbestandteile sichtbar sind. Anschließend werden rund 34 g Kieselgur unter Rühren zugeetzt und die Lösung für mindestens 2 Tage gerührt. Es ist alternativ möglich, das Kieselgur zusammen mit  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  und EDTA unter Rühren zuzugeben. Es kann anwendungsabhängig (insbesondere in Abhängigkeit vom verwendeten Braunalgenmaterial) vorgesehen sein, zusätzlich Ionenaustauschermaterial gleichzeitig mit dem Kieselgur oder Elektrographit zuzugeben. Es ist beispielsweise möglich, zusätzlich 34.2 g Amberlit als Ionenaustauscher zuzusetzen, das vorher einer Reinigung unterzogen worden ist. Diese Reinigung dient der Entfernung toxischer Substanzen und umfaßt eine Wässerung in fließendem Wasser (Dauer rund 3 Stunden).

Nach der Kieselgurbehandlung wird das Volumen der Lösung mit demineralisiertem Wasser auf 22.8 l verdünnt, um die Viskosität zu verringern. Die Verdünnung wird allgemein derart gewählt, daß die Lösung anschließend filtrierbar ist. Der Wasserzusatz hängt somit insbesondere auch vom verwendeten Braunalgenmaterial ab. Nach der Verdünnung und kurzzeitigem Durchrühren wird die Lösung für mindestens 10 Stunden stehen gelassen, um feste Bestandteile sedimentieren zu lassen. Die Standzeit kann auch im Bereich von Tagen liegen. Der Überstand wird abdekantiert und filtriert. Die Filtration erfolgt mehrstufig, wobei erst ein Tiefenfilter mit einer Porengröße von 15  $\mu\text{m}$  und anschließend ein Filter mit einer Porengröße von 0.1  $\mu\text{m}$  verwendet wird.



Anschließend folgt ein Salzzusatz zu dem Filtrat. Es wird der Zusatz von KCl bevorzugt, wobei anwendungsabhängig auch andere, entsprechende Salze eingesetzt werden können. Es wird soviel KCl als Festsubstanz zugegeben, daß sich eine 0.13 M KCl-Lösung ergibt.

Anschließend folgt eine Ethanol-Fällung. Die Menge des Ethanolzusatzes hängt davon ab, wieviel Fucoidan sich im Material befindet. Bei der ersten Ethanolfällung sollte die Ethanolendkonzentration bei Anwesenheit von Fucoidan nicht 40% überschreiten, da sonst das Fucoidan mit ausfällt. Beim angegebenen Beispiel werden rund 12 l 99%iger Ethanol zugesetzt, so daß die Endkonzentration des Ethanol in der Gesamtlösung bei rund 34% liegt. Es kann auch vorgesehen sein, daß die Ethanolkonzentration in Abhängigkeit von der Art des Ausfällens des Alginats gewählt wird. Durch Variation der Ethanolkonzentration kann erzielt werden, daß das Alginat fadenförmig oder watteförmig ausfällt. Eine derartige Ausfällung wird nach Möglichkeit angestrebt, damit das Alginat aufschwimmt bzw. weiterverarbeitet werden kann, wie dies unten erläutert wird.

Anstelle von Ethanol kann auch mindestens ein anderer Alkohol (z. B. Isopropanol) oder eine Fällungssäure zugegeben werden, wobei die Konzentration sich nach den genannten Kriterien richtet.

Während der Fällung erfolgt eine Durchströmung der Lösung mit einem Treibgas (z.B. Luft). Das ausgefällte Alginat wird während der Fällung, d.h. im Entstehen, durch die eingeblasene Luft nach oben aufgetrieben und kann von der Lösungsoberfläche leicht mit einer geeigneten Einrichtung (z.B. Netz, Sieb, oder dgl.) von der Lösung abgehoben werden. Das ausgefällte Alginat kann auch ohne Treibgaszusatz durch Dekantieren oder Umrühren mit einer Rührereinrichtung, an der ausgefälltes Algi-



nat haften bleibt, gesammelt werden. Anschließend wird das gesammelte Alginat mit einer Filterpresse entwässert, um dem stark hygroskopischen Material zumindest teilweise Wasser zu entziehen.

Die bis hier realisierten Verfahrensschritte werden anwendungsabhängig ganz, teilweise oder teilweise unter modifizierten Bedingungen wiederholt. Danach wird eine Weiterverarbeitung des gefällten Alginats wie folgt durchgeführt.

Das gefällte Alginat wird in 11.4 l und 0.5 M-KCl/10 mM-EDTA-Lösung aufgelöst. Die Auflösung erfolgt unter Rühren, bis eine homogene Lösung vorliegt. Anschließend folgt eine zweite Fällung mit rund 10 l einer 99%igen Ethanollösung unter Treibgaszuführung. Unter diesen Bedingungen beträgt die Alkoholkonzentration in der Gesamtlösung rund 44%. Bei dieser zweiten Fällung kann eine höhere Alkohol-(bzw. Säure-)Konzentration gewählt werden, da das Fucoidan (siehe oben) bereits abgetrennt ist. Allerdings wird die Konzentration des Fällungsmittels wiederum so eingestellt, daß die Bildung von faden- oder watteartigem Alginat gefördert wird. Bei nicht-optimaler Alkoholkonzentration ist das Alginat gelatineartig und kann somit nicht flotiert werden (Aufschwimmen unter Treibgaswirkung).

Anschließend wird das gefällte Alginat wieder durch eine Filterpresse entwässert und mehrmals mit der 10-fachen Menge einer 70%igen Ethanollösung gewaschen. Anschließend wird das Material bei Raumtemperatur getrocknet. Die Trocknung kann anwendungsabhängig unter sterilen Bedingungen erfolgen. Es kann nach der Waschung mit Ethanol vorgesehen sein, das Material mehrfach mit demineralisiertem Wasser zu waschen oder gegen demineralisiertes Wasser zu dialysieren, um Restspuren von Begleitstoffen zu entfernen.



Die Zahl der erfindungsgemäß durchgeführten Fällungen richtet sich nach den Verunreinigungen bzw. den toxischen Beiprodukten im Ausgangsmaterial.

Die Gewebeverträglichkeit des entsprechend dem Beispiel gewonnenen Alginats wird wie folgt geprüft. Es werden Implantationsexperimente mit normoglykämischen ( $6.1 \pm 0.4$  mM Plasmaglucose), diabetisanfälligen BB/OK-Ratten (200 + 25 Tage alt) durchgeführt. Diese Ratten besitzen eine erheblich höhere Empfindlichkeit gegen Verunreinigungen in Alginaten als die oben genannten Lewisratten.

$Ba^{2+}$ -Alginatkapseln wurden aus dem hochgereinigten Alginat entsprechend der Verfahrensweise hergestellt, die in DE-OS 42 04 012 A1 beschrieben ist. Die Alginatkapseln besitzen einen mittleren Durchmesser von 200  $\mu$ m bis 400  $\mu$ m. Die Implantation erfolgte unter die Nierenkapsel der BB/OK-Ratten. Die Empfängertiere blieben normoglykämisch und zeigten keinen Verlust an Körpergewicht. Nach drei Wochen wurden die Tiere getötet, die Nieren herausgenommen und in Bouin'scher Lösung fixiert. Nach Einbettung in Paraffin folgte die Präparation von 7  $\mu$ m-Schnitten. Jeder 20. Schnitt von zwei unabhängigen Individuen wurde zur histologischen Untersuchung herangezogen.

Das Ergebnis der Untersuchung für verschiedene Proben im Vergleich mit Rohalginat ist in der folgenden Tabelle zusammengestellt:





Resultat für zwei unabhängige Proben:

Probe	Ratte #	Histologische Beurteilung (Fibrose)	Endotoxingehalt einer 0,25%igen Lösung des Alginats
S1	V159	(+)	1 EU/ml
	V161	+	
S2	V454	0	3,5 EU/ml
Rohalginat	V12	++++	> 1000 EU/ml

(Legende:

0: keine Reaktion, (+): sehr schwache Reaktion, +: schwache Reaktion, ++++: sehr starke Fibrose)

Es zeigt sich, daß die Implantation mit erfindungsgemäßem Alginat keine oder nur eine sehr schwache Reaktion auslöst, wohingegen bei Implantation mit kommerziell angebotenem Rohalginat eine sehr starke Fibrose auftritt.

Der Endotoxingehalt, der charakteristisch für einen potentiellen Bakterienbefall ist, zeigt im Falle der hochgereinigten Alginate hervorragende, nahezu vernachlässigbare Werte, wohingegen der Vergleichswert des kommerziellen Rohalginats rd. tausendfach größer ist.

Am erfindungsgemäß hergestellten, hochgereinigten Alginat wurde auch unter Anwendung der folgenden Testverfahren festgestellt, daß keine Verunreinigungen von toxischen Substanzen gegeben ist. Die Testverfahren umfassen insbesondere fluoreszenzspektroskopische Verfahren und Endotoxin- oder Mitogenaktivitäts-Essays, wie sie von G. Klöck et al. in "Appl. Microbiol. Biotechnology" (Band 40, 1994, Seite 638 ff) und in "Biomaterials" (Band 18, 1997, Seite 707) beschrieben sind, NMR-spektroskopische Verfahren, die Bestimmung des antioxidativen Potentials des hochgereinigten Alginats durch Ermittlung der Reaktion auf Zugabe von HOCl und über die Bestimmung der oxidativen Aktivität neutrophiler Granulozyten unter Zuhilfenahme der Chemolumineszenz (siehe K. Arnold in "Abhandlungen der sächsischen Akademie der Wissenschaften zu



Leipzig", Band 58, 1997, Heft 5) und das Verfahren der "Free Flow Electrophoresis" wie es von U. Zimmermann et al. in "Electrophoresis" (Band 13, 1992, Seite 269) beschrieben ist. Eine toxische Verunreinigung wurde mit diesen Verfahren nicht bestimmt.

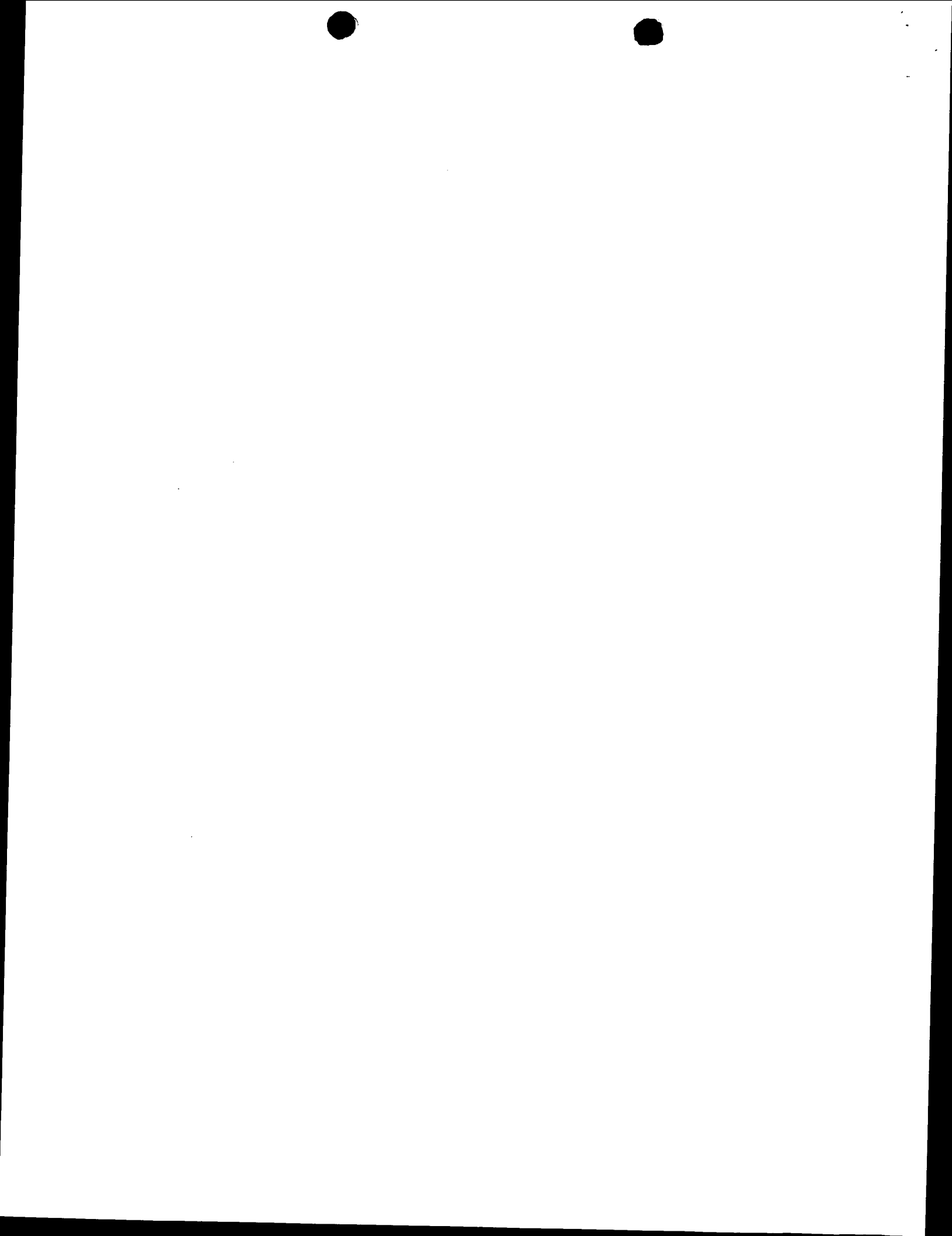
Nach den in der oben genannten Publikation von G. Klöck et al. (1997) angegebenen Verfahren wurde ferner das Verhältnis von Mannuron- zu Guluronsäure mit Hilfe der sogenannten "Circular Dichroismus-Spectroscopy" bzw. mit der IR-Spektroskopie ermittelt. Ferner wurde auch das Molekulargewicht über die Bestimmung der Viskosität ermittelt.

Die mit  $Ba^{2+}$  vernetzten Kapseln aus Alginat besitzen eine hervorragende Elastizität, wie es mit Hilfe von Kompressionsmessungen nachgewiesen werden konnte.

## Beispiel 2

Beim zweiten Beispiel wird auf 10 g trockene Algen Bezug genommen. Bei größeren Ausgangsmassen sind die im folgenden gegebenen quantitativen Größen entsprechend linear umzurechnen. Im Unterschied zu Beispiel 1 erfolgt die Alginatgewinnung bzw. -reinigung vorteilhafterweise ohne eine Wässerung oder Quellung. Das trockene Ausgangsmaterial wird vielmehr unmittelbar in eine EDTA-Lösung gegeben. Die EDTA-Lösung besitzt eine Konzentration im Bereich von rd. 10 bis 50 mM. Die Suspension wird 24 Stunden gerührt und anschließend zur Entfernung von Festmaterial gesiebt. Ein weiterer Vorteil der beim zweiten Beispiel erläuterten Verfahrensweise besteht darin, daß der EDTA-Verbrauch und auch der Alkoholeinsatz verringert wird.

Es kann vorgesehen sein, daß der Suspension während der EDTA-Behandlung zusätzlich Aktivkohle zugesetzt wird. Die Masse



der zugesetzten Aktivkohle beträgt vorzugsweise etwa 10 bis 200 % der eingewogenen Algentrockenmasse.

Anschließend erfolgt unmittelbar ohne einen gesonderten Sedimentationsschritt eine Filtration der Suspension. Die Filtration erfolgt zweistufig, wobei erst ein Vor- oder Tiefenfilter mit einer Porengröße von 15  $\mu\text{m}$  und anschließend ein Filter mit einer Porengröße von 0.2  $\mu\text{m}$  verwendet wird.

Nach einem Salzzusatz zu dem Filtrat wie bei Beispiel 1 (z. B. Bildung einer 0.13 M KCl-Lösung) folgen mehrere Ethanol-Fällungen. Für die erste Fällung wird 99%iger Ethanol (vergällt mit Aceton) zugesetzt, so daß sich eine Endkonzentration des Ethanol in der Gesamtlösung von 37.5% ergibt. Das Fällungsprodukt wird aufgesammelt und in eine 0.5M KCl-Lösung (ohne EDTA) gegeben. Das Volumen der KCl-Lösung wird auf ein Drittel des Lösungsvolumens vor der Fällung eingestellt.

Für die zweite Fällung wird wiederum 99%iger Ethanol (vergällt mit Aceton) zugesetzt, so daß sich hier eine Endkonzentration des Ethanol in der Gesamtlösung von 44% ergibt. Das Fällungsprodukt wird aufgesammelt und in bidestilliertes Wasser mit einem Volumen entsprechend dem Volumen der KCl-Lösung nach der ersten Fällung gegeben.

Vor der dritten Fällung kann eine Dialyse des bei der zweiten Fällung gewonnenen Fällungsprodukts durchgeführt werden. Die Dialyse, die kein zwingendes Verfahrensmerkmal ist, erfolgt für die Dauer von 3 Tagen mit 3 Wasserwechseln pro Tag. Für die dritte Fällung wird wiederum 99%iger Ethanol (vergällt mit Aceton) zur Einstellung einer Endkonzentration des Ethanol in der Gesamtlösung von 50% zugesetzt. Das Fällungsprodukt wird aufgesammelt und getrocknet.



### Beispiel 3

Im folgenden wird ein Beispiel zur Transplantationschirurgie, nämlich die Mikrokapsulierung Langerhans'scher Inseln, beschrieben.

Isolierte Langerhans'sche Inseln wurden in einer Lösung von 0.9% NaCl und 0.5% des gereinigten Alginats suspendiert. Diese Suspension wurde durch eine in Fig. 1 gezeigte Sprühdüse 10 fein zertropft. Die Düse hat ein bewegliches inneres Hohlrohr 20 (innere Düse) mit Lüranschluß (innerer Durchmesser 350 µm bzw. 2 mm), ein mittleres Hohlrohr 30 (mittlere Düse) mit einem Durchmesser von 1 mm bzw. 3.5 mm und einen äußeren Kanal 40, der in einem justierbaren Luftfokussierkopf 50 mündet. Diese Elemente wurden an einem Düsenkopf 60 montiert, an dem sich Druckluft- und Lüranschluß befinden.

Die Inselsuspension in Alginat wird durch den zentralen Düsenkanal gedrückt. Durch den umgebenden Kanal wird eine Lösung von 0.5 bis 2% des Alginats in 0.9% Kochsalzlösung appliziert. Bei den am Düsenausgang entstehenden Tropfen umschließt auf diese Weise die äußere Alginatlösung (0.5 bis 2%) die in der 0.5%igen Alginatlösung suspendierten Inseln. Durch den äußeren, dritten Kanal wird Druckluft zugeführt, welche die Tropfen von der Düsenöffnung abschert. Die Druckluft wurde auf 30 bis 40 mbar (7 bis 8 l/min) eingestellt. Die Alginattropfen 70 wurden in 40 mL Vernetzerlösung mit 20 mM BaCl<sub>2</sub> und 5 mM Histidin geliert. Die Vernetzerlösung ist mit NaCl auf eine physiologische Konzentration (290 mOsmol) eingestellt. Die Kapseln wurden dann dreimal entsprechend mit isotoner Kochsalzlösung gewaschen.

Mit dem erfindungsgemäßen Alginat können allgemein Umhüllungen für allogene und xenogene Gewebe, insbesondere endokrines Gewebe, hergestellt werden.





## Weitere Charakterisierung erfindungsgemäßen Alginatmaterials

### 1. Fluorimetrischer Phenolnachweis

Erfindungsgemäße Alginat enthalten keine störenden Verunreinigungen auf der Basis von Phenolen, Polyphenolen und anderen Phenolverbindungen. Diese Phenolfreiheit bedeutet, daß die genannten Verunreinigungen nicht oder in einem derart geringen Gehalt in den Alginaten enthalten sind, daß Anwendungen in der Biologie und Medizin, insbesondere die obengenannten Anwendungen, nicht durch Immunreaktionen oder dergleichen gestört werden. Die Phenolfreiheit wird mit einer fluorimetrischen Analyse nachgewiesen, die von G. Skajk-Braek et al. (s. "Biotechnology and Bioengineering", Bd. 33, 1989, S. 90 ff.) beschrieben worden ist. Die Fluoreszenzmessung wird mit einem Spektrometer LS50 (Perkin-Elmer, Beaconsfield) durchgeführt. Bei einer Anregungswellenlänge von 366 nm ergeben sich die in Fig. 2 gezeigten Fluoreszenzspektren an Lösungsproben während der Reinigung gemäß Beispiel 2. Vor und nach der anfänglichen Filtration zeigt die Alginatlösung eine starke Fluoreszenz im Bereich zwischen 380 und 550 nm (obere Spektren). Nach den Filtrations- und Fällungsschritten ist die Fluoreszenz erheblich vermindert. Die Konzentration der Endlösung beträgt rd. 0,2-0,3%. Es verbleibt lediglich ein Fluoreszenzmaximum bei 418 nm, was der Lösungsmittelfluoreszenz entspricht. Im erfindungsgemäß gereinigten Alginat ist die Fluoreszenz der Phenole und Phenolverbindungen auf weniger als rd. 10% gegenüber der ungereinigten Alginatlösung reduziert.

Fig. 2 zeigt, daß die Phenolgehalte im Laufe des erfindungsgemäßen Verfahrens drastisch abnehmen und daß das gereinigte Alginat eine Emission zeigt, die nur noch geringfügig über den Werten hochreinen Wassers liegt.



## 2. Fluorimetrischer Proteinnachweis

Die Proteinfreiheit erfindungsgemäßer Alginatate wird wie bei der Analyse gemäß 1. fluorimetrisch nachgewiesen. Fig. 3 zeigt, daß bei einer Anregungswellenlänge von 270 nm vor der Reinigung eine starke Emission im Bereich von 300 bis 500 nm gemessen wird. Diese Emission fällt im Laufe der Reinigung auf einen Wert unterhalb von 20% der Fluoreszenz der ungereinigten Alginatlösung ab. Nach der letzten Fällung ist die Fluoreszenz nicht mehr nachweisbar oder vernachlässigbar klein.

## 3. Phenolnachweis nach Folin-Denis bzw. mit DMBA

Der Folin-Denis-Nachweis färbt sämtliche phenolhaltige Verbindungen. Erfindungsgemäß hergestellte Alginatate zeigen bei diesem Nachweise keine Extinktion. Der Folin-Denis-Nachweis wird unter den folgenden Bedingungen durchgeführt:

Die zu analysierende Alginatlösung (0,5 ml) wird mit 1 ml Methanol zur Extraktion versetzt. Die Probe wird nach intensivem Schütteln für ca. 8h in den Kühlschrank gestellt. Das ausgefallene Alginat wird abzentrifugiert, 10 µl des Überstandes werden in 40 µl des Folin-Denis Reagenz (Fluka, Deisenhofen, Deutschland), 80 µl 1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  und 120 µl  $\text{H}_2\text{O}$  (Reihenfolge einhalten) gegeben. Nach intensivem Schütteln erfolgt die Farbentwicklung im Wasserbad bei 50°C für 30 min. Es folgt die Messung der optischen Dichte mit Hilfe eines Photometers bei einer Wellenlänge von 650 nm (oder 725 nm).

Auch beim Zusatz von Dimethoxybenzaldehyd (DMBA) zeigen die erfindungsgemäßen Alginatate keine photometrisch auswertbare Farbreaktion. Dieser Test wurde unter den folgenden Bedingungen ausgeführt: Die zu analysierende Alginatlösung (0,5 ml) wird mit 1 ml Methanol zur Extraktion versetzt. Die Probe wird nach intensivem Schütteln für ca. 8h in den Kühlschrank



gestellt. Das ausgefallene Alginat wird abzentrifugiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von 10 µl des Überstandes in die DMBA Lösung, die wie folgt hergestellt wurde: 2 g DMBA (Fluka, Deisenhofen, Deutschland) werden in 100 ml Eisessig gelöst. 16 ml HCl (37%) werden mit Eisessig auf 100 ml aufgefüllt. Beide Lösungen sind kurz vor der Verwendung 1:1 zum Arbeitsreagenz zu mischen.

Es folgt die Messung der optischen Dichte mit Hilfe eines Photometers bei einer Wellenlänge von 490 nm (oder 510 nm) gegen eine Eichreihe Phloroglucinol (Sigma, Deisenhofen, Deutschland).

#### 4. Proteinnachweis nach Bradford

Der Proteinnachweis nach Bradford (s. "Anal. Biochem.", Bd. 72, 1976, S. 248 ff.) basiert auf der Tatsache, daß der Farbstoff Coomassie brilliant blue sehr spezifisch an Proteine anbindet, wodurch es zu einem Farbumschlag von rot nach blau kommt. Die Intensität der Blaufärbung korreliert linear mit der Proteinmenge und kann photometrisch quantifiziert werden. Mit dieser Methode sind Proteine bis in den unteren µg-Bereich nachweisbar. Es wurden 10 µl einer 0,5%igen Alginatlösung untersucht. Als farbstoffhaltige Nachweissubstanz wurde das sogenannte Bradford-Reagenz (Hersteller Sigma, Steinheim, Deutschland) der Alginatlösung zugesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurde die Probenabsorption photometrisch bei 570 nm unter Verwendung eines "Thermomex Microplate Reader"-Gerätes (Hersteller Molecular Devices, Manlow Park, USA) gemessen. In der erfindungsgemäßen Alginatlösung wurden mit diesen Verfahren keine Proteine gefunden.



## 5. XTT- und MTT-Tests

Die Biokompatibilität der erfindungsgemäß gereinigten Alginat- te kann mit den folgenden Tests gezeigt werden. Lebende Zellen, wie Maus-Lymphozyten oder Fibroblasten werden für einige Tage mit den Alginaten in Kultur gehalten. Weisen die Alginat- te eine immunogene Wirkung auf, so werden die Zellen stimu- liert oder inhibiert (um den Effekt der Stimulation zu ver- deutlichen können zusätzliche Stimulanzien, z.B. LPS oder PHA in die Kultur gegeben werden). Die bei Lymphozyten erhöhte und bei Fibroblasten verminderte Stoffwechselaktivität kann anhand der Umsetzung eines Farbstoffs (XTT oder MTT) durch mitochondrielle Dehydrogenasen visualisiert und photometrisch quantifiziert werden. Bei erfindungsgemäß gereinigten Alginat- ten ist die Farbstoffumsetzung vernachlässigbar gering (s. Fig. 4), wohingegen bei kommerziellen Alginaten eine starke Farbstoffumsetzung nachweisbar ist. Fig. 4 zeigt die Ergeb- nisse der Farbtests für verschiedene LPS-Vorstimulierungen.

Die Kultivierung der Zellen wurde unter den folgenden Bedin- gungen durchgeführt. Die Lymphozytensuspension ( $1 \cdot 10^6$  Zel- len/ml in Complete Growth Medium) wird mit verschiedenen Kon- zentrationen an Lipopolysacchariden (LPS, Endkonzentration: 0,01  $\mu\text{g/ml}$ ) und Alginatlösung (Endkonzentration: 0,05%) ver- setzt und 3 Tage bei 5%  $\text{CO}_2$  und  $37^\circ\text{C}$  kultiviert. Danach wird die Suspension mit einer Lösung des Tetrazoliumsalzes (XTT oder MTT) und für weitere 6h inkubiert. Es folgt die Messung der optischen Dichte bei 450 nm (Referenzmessung bei 650 nm).

## 6. Versuche in BB/OK-Ratten

Wie oben bei Beispiel 1 beschrieben, kann die Biokompatibili- tät erfindungsgemäßer Alginat- te auch durch in vivo-Tests an BB/OK-Ratten gezeigt werden, deren Immunsystem eine erhöhte Makrophagenaktivität aufweist. Erfindungsgemäß gereinigtes





Alginat, das entsprechend den oben beschriebenen Schritten kapselförmig in Ratten-Nieren implantiert worden ist, verursacht nach 3 Wochen Inkubationszeit keine Fibrosen.

## 7. Elektrorotation

Die Biokompatibilität der erfindungsgemäß gereinigten Alginatate kann auch mit folgendem Test gezeigt werden. Lebende Zellen, wie Human-Lymphozyten oder Maus-Lymphozyten werden für einige Tage mit Alginaten in Kultur gehalten. Weisen die Alginatate eine immunogene Wirkung auf, reagieren die Zellen mit einer stark vergrößerten Membranoberfläche (Zunahme der Mikrovilli) (um diesen Effekt zu verdeutlichen können zusätzliche Stimulanzien, z.B. LPS oder PHA in die Kultur gegeben werden). Eine solche Zunahme läßt sich über eine Erhöhung in der spezifischen Membrankapazität  $C_m$  ermitteln. Die Elektrorotation der Zellen unter Wirkung hochfrequenter elektrischer Felder bietet eine Möglichkeit, diese Veränderungen der Lymphozytenmembran auf dem Einzelzellniveau nachzuweisen. Bei erfindungsgemäß gereinigten Alginaten läßt sich keine Erhöhung der spezifischen Membrankapazität messen, wohingegen bei kommerziellen Alginaten eine Erhöhung dieses Wertes nachweisbar ist.

Die Messungen wurden unter folgenden Bedingungen ausgeführt. Die Lymphozytenzellsuspension ( $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml in Complete Growth Medium) wird mit einer Alginatlösung (Endkonzentration: 0,05%) versetzt und 3 Tage bei 5%  $\text{CO}_2$  und  $37^\circ\text{C}$  kultiviert. Danach wird die Suspension 2 x in isoosmolaler Inositolösung (290 mOsm/kg) gewaschen, anschließend gut resuspendiert. Bei verschiedenen Leitfähigkeiten (10, 25, 40  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), eingestellt mit HEPES-KOH, pH 7,2) erfolgt die Bestimmung der charakteristischen Frequenz (Maximum) der Antifeldrotation mittels der Kompensationsmethode. Mit Hilfe einer linearen Regression der mit dem Zellradius normierten charakteristi-



schen Frequenzen, aufgetragen gegen die externe Leitfähigkeit, kann man die elektrischen Parameter (Kapazität und Leitfähigkeit) der Plasmamembran bestimmen. Die elektrischen Parameter der in Anwesenheit erfindungsgemäßer Alginat kultivierten Zellen bleiben unverändert, wohingegen die mit kommerziellen Alginaten kultivierten Zellen eine Zunahme der Membrankapazität um 10 bis 50 % aufweisen.

#### 8. Zellgröße und Zellzahl

Die Biokompatibilität der erfindungsgemäß gereinigten Alginat kann auch mit folgendem Test gezeigt werden. Lebende Zellen, wie Human-Lymphozyten oder Maus-Lymphozyten werden für einige Tage mit Alginaten in Kultur gehalten. Weisen die Alginat eine immunogene Wirkung auf, so vergrößern sich die Zellen und es erhöht sich die Anzahl der Zellen (um diesen Effekt zu verdeutlichen, können zusätzliche Stimulanzien, z.B. LPS oder PHA in die Kultur gegeben werden). Die Zellgröße und die Zellzahl kann mit Hilfe des CASY1 Cell Analyzer (Model TTC, Schärfe Technology, Reutlingen, Deutschland), der nach dem Coulter Prinzip arbeitet, ermittelt werden. Ein solches Gerät erlaubt die schnelle, genaue Erfassung (Größe, Größenverteilung und Zellzahl) mehrerer tausend Zellen pro Messung. Bei erfindungsgemäß gereinigten Alginaten läßt sich keine signifikante Zellvergrößerung und Erhöhung der Zellzahl nach Inkubation messen, wohingegen bei kommerziellen Alginaten eine deutliche Zellvergrößerung (rd. 50 %) und eine erhöhte Zellzahl (35 bis 50 %) nachweisbar ist.

Die Messungen wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt. Die Lymphozytensuspension ( $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml in Complete Growth Medium) wird mit einer Alginatlösung (Endkonzentration: 0,05%) versetzt und 3 Tage bei 5%  $\text{CO}_2$  und  $37^\circ\text{C}$  kultiviert. Danach wird ein abzentrifugiertes und in Inosit (oder



PBS) aufgenommenes Aliquot (100  $\mu$ l) der gut resuspendierten Lymphozytensuspension 2 x in isoosmolaler InositolLösung (290 mOsm/kg) gewaschen und in 10 ml PBS (phosphatgepufferte Saline) aufgenommen und sofort im CASY1 gemessen. Aus den CASY-Histogrammen kann der Anteil der großen, stimulierten Zellen an der Gesamtpopulation berechnet werden.



### PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Gewinnung einer hochgereinigten Alginatzusammensetzung, mit den Schritten:

- Extrahieren von Algenmaterial oder Rohalginat in einer Lösung mit einem Komplexbildner,
- Filtern der Lösung,
- Ausfällen von Alginat aus der Lösung, und
- Sammeln des gefällten Alginats.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem zum Extrahieren als Komplexbildner Ethylendiammentetraessigsäure verwendet wird.

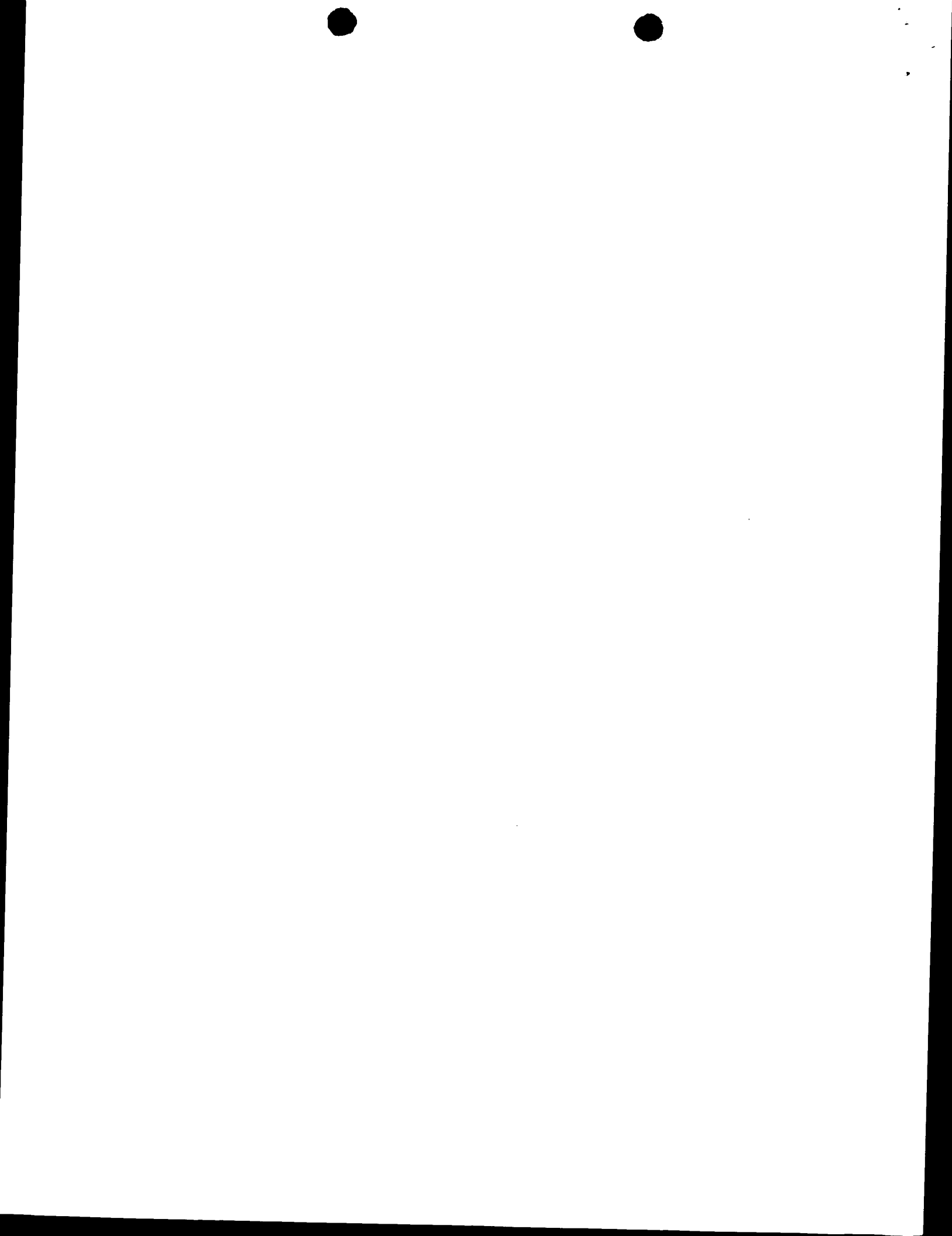
3. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem das Extrahieren in einer Sodalösung erfolgt.

4. Verfahren gemäß Anspruch 2 oder 3, bei dem zum Extrahieren der Lösung Aktivkohle zugesetzt wird.

5. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem vor dem Filtern der Lösung ein Sedimentieren von Zellbestandteilen und Partikeln mit einem porösen Bindemittel aus der Lösung erfolgt.

6. Verfahren gemäß Anspruch 5, bei dem das Sedimentieren mit einem porösen Granulat auf der Basis von Kieselgur, Zellulose oder Recycling-Materialien aus nachwachsenden Rohstoffen erfolgt.

7. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem das Filtern mit Tiefenfiltern jeweils abnehmender Porengröße erfolgt.

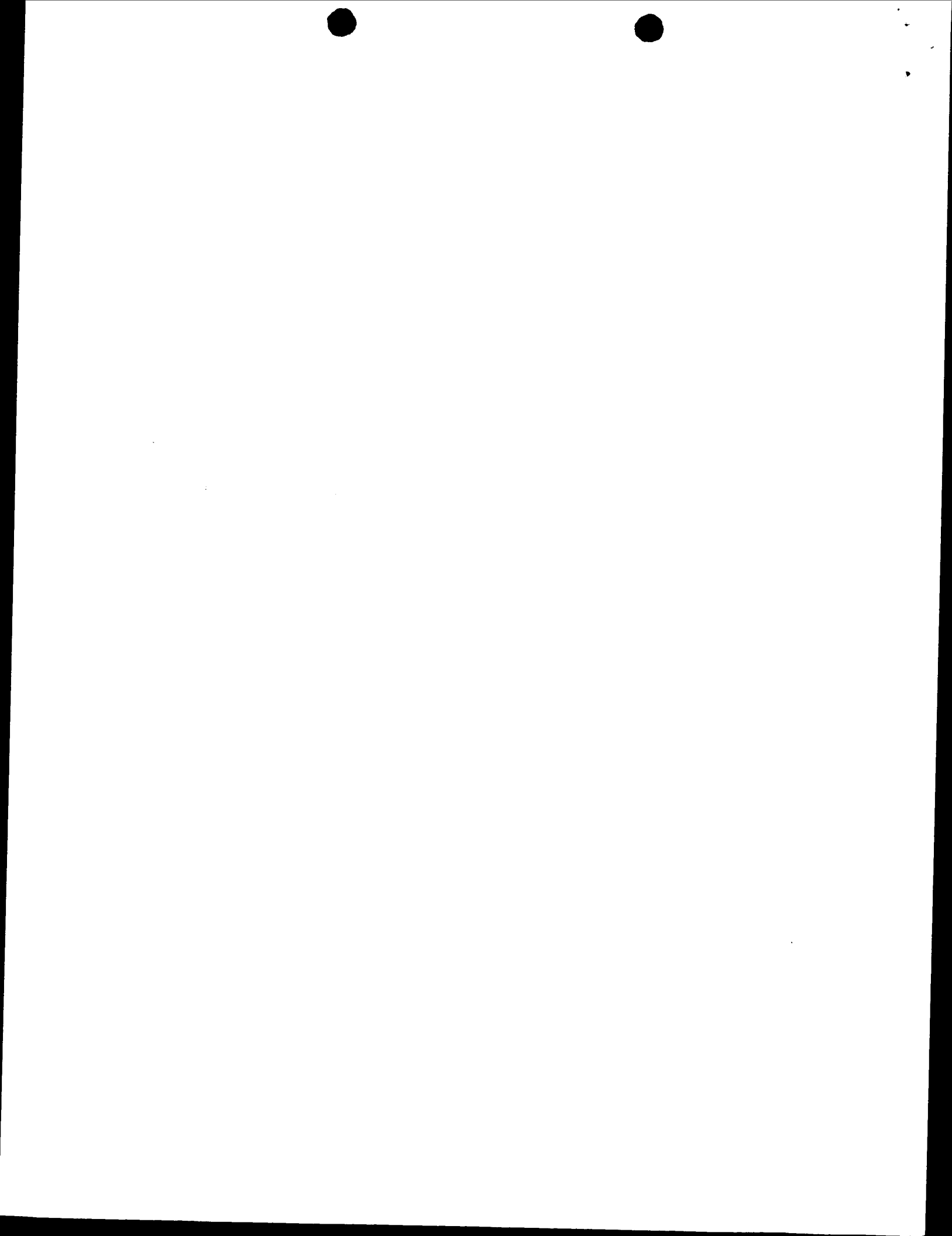




8. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem das Ausfällen von Alginat mit Ethanol erfolgt.
9. Verfahren gemäß Anspruch 6, bei dem der Ethanolgehalt im Bereich von 10-50 % gewählt ist.
10. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem das Sammeln des ausgefällten Alginats durch Aufschäumen aus der Lösung, durch Dekantieren der Lösung oder durch Rühren der Lösung mit einer Rühr- und Sammeleinrichtung erfolgt.
11. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem das Entwässern des Alginats bei Raumtemperatur erfolgt.
12. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem nach dem Entwässern das Extrahieren, Filtern, Fällen und Entwässern mindestens einmal wiederholt wird.
13. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem als Algenmaterial in der Natur vorkommende Algenfrischmaterial oder in einem Bioreaktor bzw. Tankanlage kultiviertes Algenfrischmaterial oder Algenmaterial aus fusionierten oder regenerierten Algenzellen oder kommerzielles Alginat verwendet wird.
14. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem als Algenmaterial bestimmte Organ- oder Gewebeteile von Algen oder Algenteile bzw. bestimmte Organ- oder Gewebeteile von Algen oder Algenteilen aus bestimmten Stadien des Entwicklungszyklus von Algen verwendet werden.
15. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem als Algenmaterial Braunalgen oder andere alginatproduzierende Süßwasser- oder Salzwasseralgen verwendet werden.



16. Alginatzusammensetzung, die als Mischpolymer aus Mannuronsäure und Guluronsäure besteht, **dadurch gekennzeichnet**, daß im Mischpolymer ein Verhältnis von Mannuronsäure zu Guluronsäure im Bereich von 1% bis 90% gegeben ist und das mittlere Molekulargewicht des Mischpolymers größer als 250 kD ist.
17. Alginatzusammensetzung, die in wässriger Lösung mit einer 0.1%-igen Konzentration eine Viskosität im Bereich von 10 bis 15 mPa · s besitzt.
18. Alginatzusammensetzung, die in wässriger Lösung mit einer 0.5%-igen Konzentration eine Viskosität von 250 bis 300 mPa · s besitzt.
19. Alginatzusammensetzung, die in wässriger Lösung bei Beleuchtung mit einer Anregungswellenlänge von 366 nm im Spektralbereich von 380 bis 550 nm keine Fluoreszenzemission zeigt.
20. Alginatzusammensetzung, die bei Farbttests mit der Folin-Denis-Reagenz oder mit Dimethoxybenzaldehyd keine Einfärbung zeigt.
21. Alginatzusammensetzung, die in wässriger Lösung bei Beleuchtung mit einer Anregungswellenlänge von 270 nm im Spektralbereich von 300 bis 500 nm keine Fluoreszenzemission zeigt.
22. Alginatzusammensetzung, die keine mit dem photometrischen Proteinnachweis nach Bradford nachweisbaren Proteine enthält.
23. Alginatzusammensetzung, die bei Implantation in die Nieren von BB/OK-Ratten keine signifikante immunologische Reaktion auslöst.



24. Alginatzusammensetzung, die nach Anwendung des XTT/MTT-Tests, oder der Zellrotationsmethode, oder einer elektrischen Zellzahl- und Zellgrößenbestimmung zu keiner nachweisbaren Lymphozytenaktivierung führt.

25. Alginatzusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 16 bis 24, die nach einem der Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15 hergestellt ist.

26. Verwendung einer Alginatzusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 16 bis 25 zur Herstellung von Alginatkapseln oder -umhüllungen für die Transplantationschirurgie und für andere medizinische Anwendungen und für die Lebensmittelindustrie.

27. Verwendung einer Alginatzusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 16 bis 25 zur Herstellung von Alginatkapseln oder -umhüllungen für allogene und xenogene Gewebe.

28. Verwendung einer Alginatzusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 16 bis 25 zur Herstellung von Alginatkapseln oder -umhüllungen für Langerhans'sche Inseln, Nebenschilddrüsengewebe, endokrines Gewebe oder dopamin-sezernierende Zellen.



14720/PCT Ri

### ZUSAMMENFASSUNG

Ein Verfahren zur Gewinnung einer hochgereinigten Alginatzusammensetzung enthält die Schritte Extrahieren von Algenmaterial oder Rohalginat mit einem Komplexbildner in einer Lösung, Sedimentieren von Zellbestandteilen und Partikeln aus der Lösung, Filtern der Lösung, Ausfällen von Alginat aus der Lösung und Sammeln des gefällten Alginats. Eine als Mischpolymer aus Mannuronsäure und Guluronsäure bestehende Alginatzusammensetzung besitzt ein Verhältnis von Mannuronsäure zu Guluronsäure im Bereich von 1% bis 90% und ein mittleres Molekulargewicht bis zu oder oberhalb von 1.000 kD.

(Fig. 2)





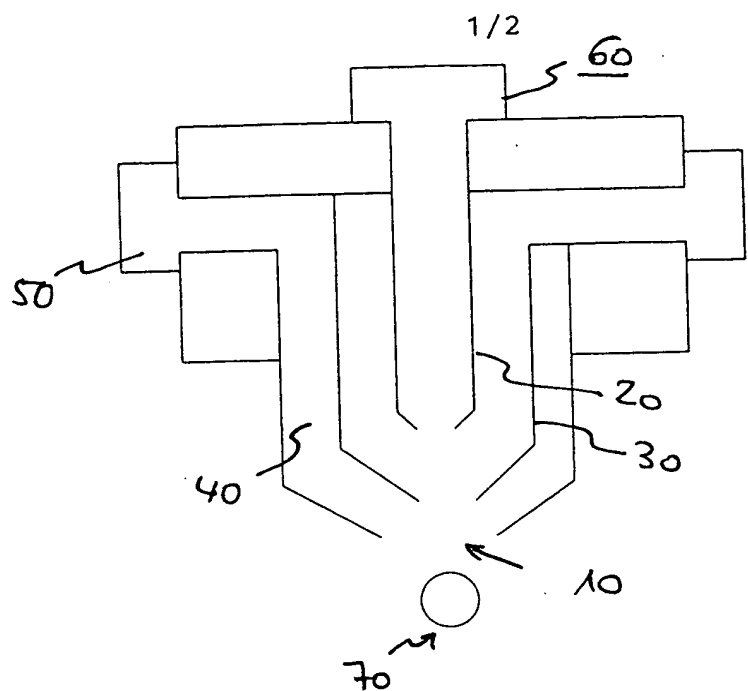
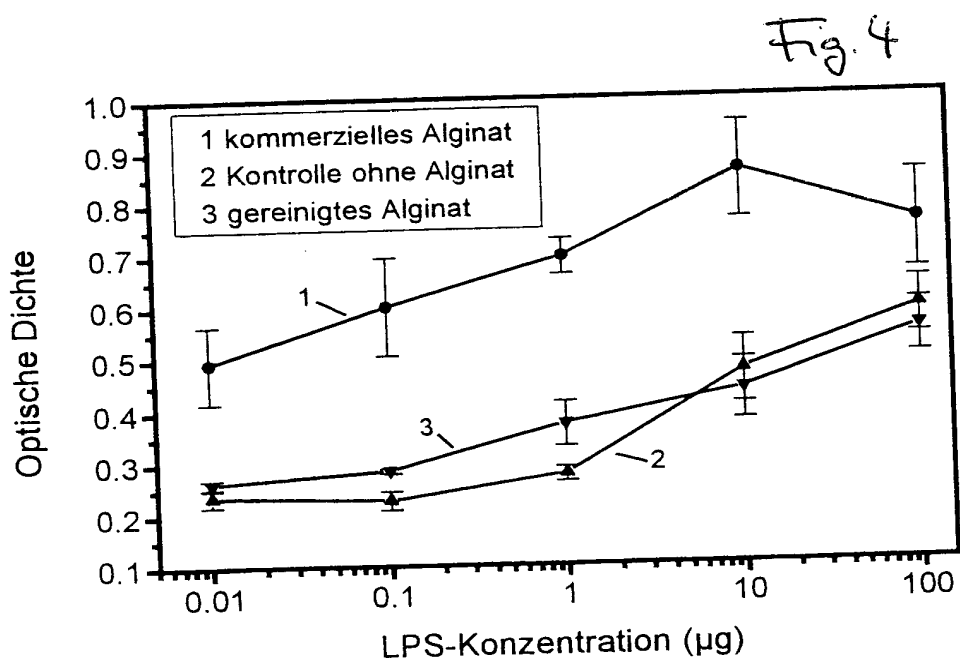


Fig. 1





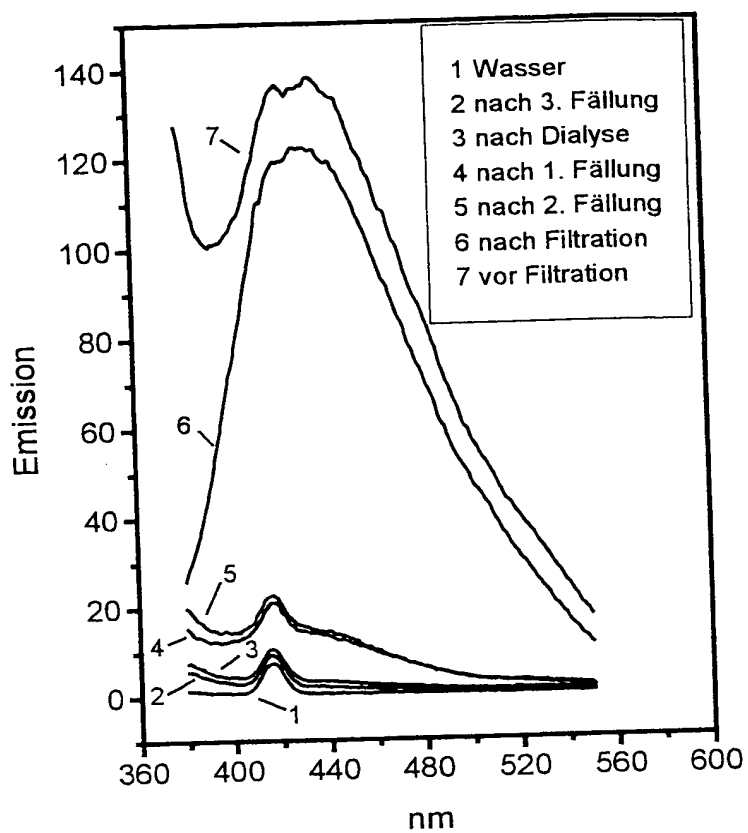


Fig. 2

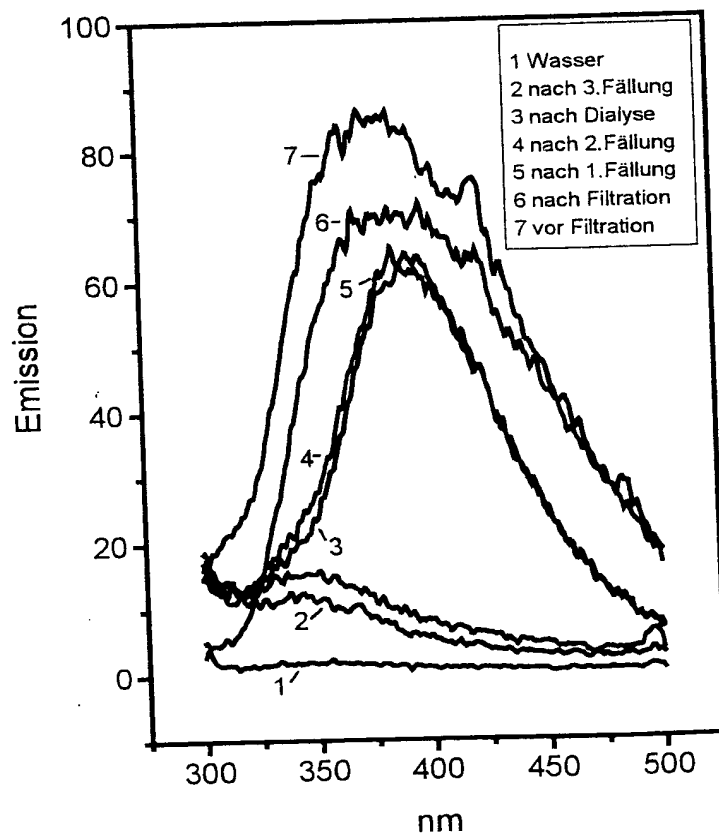


Fig. 3



VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT  
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

09 / 7 6 2 8 5 0

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts <b>14720/PCT Ri</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/EP 99/ 05867</b>	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) <b>12/08/1999</b>
(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) <b>14/08/1998</b>	
Anmelder <b>ZIMMERMANN, Ulrich et al.</b>	

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 2 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.
- ☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.
- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das
- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**

- ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
- ☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**

- ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
- ☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 2

- ☒ wie vom Anmelder vorgeschlagen
- ☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.
- ☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.
- ☐ keine der Abb.



**A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
IPK 7 C08B37/04

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole )  
IPK 7 C08B

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 93 24077 A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 9. Dezember 1993 (1993-12-09) Seite 10, Zeile 13 -Seite 11, Zeile 26 ---	1-28
A	KLOCK G ET AL: "Biocompatibility of mannuronic acid-rich alginates" BIOMATERIALS,GB,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., BARKING, Bd. 18, Nr. 10, Seite 707-713 XP004063784 ISSN: 0142-9612 ---	
A	WO 93 16111 A (ZIMMERMANN ULRICH) 19. August 1993 (1993-08-19) -----	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

11. November 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

26/11/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Lensen, H





# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/05867

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
W0 9324077 A	09-12-1993	US 5429821 A	04-07-1995
		AU 4409793 A	30-12-1993
		CA 2135770 A	12-09-1993
		EP 0642326 A	15-03-1995
		JP 7507550 T	24-08-1995
		US 5578314 A	26-11-1996
		US 5643594 A	01-07-1997
		US 5693514 A	02-12-1997
W0 9316111 A	19-08-1993	DE 4204012 A	19-08-1993
		AT 150469 T	15-04-1997
		DE 59305882 D	24-04-1997
		DK 626974 T	23-06-1997
		EP 0626974 A	07-12-1994
		ES 2101299 T	01-07-1997
		GR 3023797 T	30-09-1997
		JP 7503985 T	27-04-1995



09 07 62 85 0 T 5

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM  
GEBIET DES PATENTWESENS**

**PCT**

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT**

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)


REC'D 01 DEC 2000  
WIPO PCT

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 14720/PCT/Vu	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/05867	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 12/08/1999	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 14/08/1998
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C08B37/04		
Anmelder ZIMMERMANN, Ulrich et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
- ☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).
- Diese Anlagen umfassen insgesamt 6 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags  23/02/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  28.11.2000
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:   Europäisches Patentamt - P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl Fax: +31 70 340 - 3016	Bevollmächtigter Bediensteter  Lensen, H  Tel. Nr. +31 70 340 2428





**I. Grundlage des Berichts**

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):  
**Beschreibung, Seiten:**

1-3,5-29	ursprüngliche Fassung		
4,4a	eingegangen am	09/08/2000	mit Schreiben vom 09/08/2000

**Patentansprüche, Nr.:**

1-27	eingegangen am	09/08/2000	mit Schreiben vom 09/08/2000
------	----------------	------------	------------------------------

**Zeichnungen, Blätter:**

1/2,2/2	ursprüngliche Fassung
---------	-----------------------

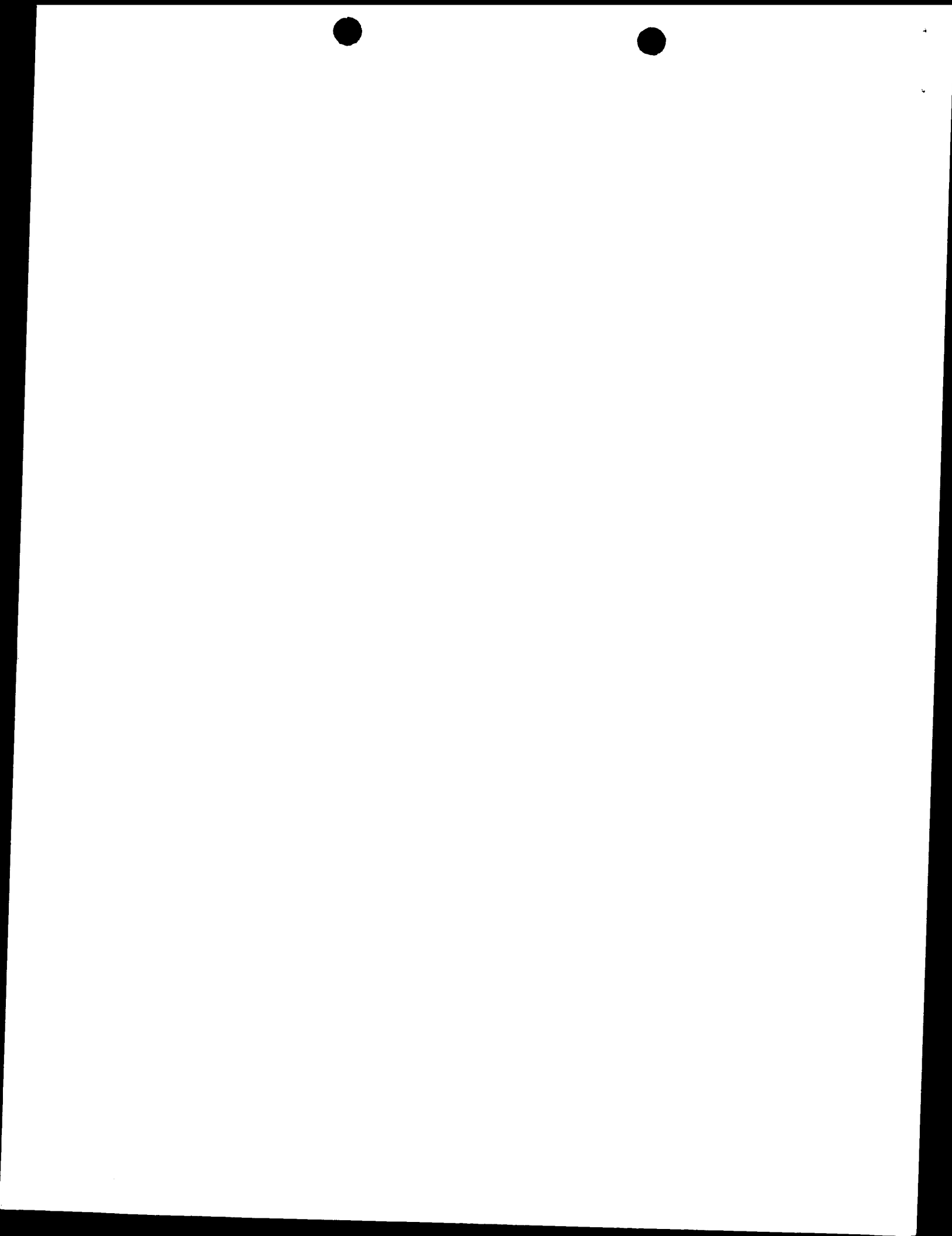
2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen Behörde in der Sprache: , zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, dass das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, dass die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.



# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/05867

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung,      Seiten:
- ☐ Ansprüche,      Nr.:
- ☐ Zeichnungen,      Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

*(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).*

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

## V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

### 1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-14
	Nein: Ansprüche	15-27
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1-27
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-27
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen  
siehe Beiblatt

## VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:  
siehe Beiblatt





**Zu Punkt V**

**Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

1). Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1 : WO-A-93/24077

D2 : Biomaterials, 18 (1997), Seite 707-713

D3 : WO-A-93/16111

D4 : US-A-5459054

D5 : US-A-5622718

Die Dokumente D4 und D5 wurden im internationalen Recherchenbericht nicht angegeben.

2). Neuheit (Art. 33(2) PCT :

D2 offenbart ein Verfahren zur Herstellung einer mitogenfreien Substanz, die nach längeren Kontakt mit den lebenden Organismus keine immunologischen Reaktionen zeigt und betrifft ein Mischpolymer aus Guluronsäure und Mannuronsäure, wobei die molare Zusammensetzung der Rest Mannuronsäure 70% beträgt und ein Molekulargewicht von 10 bis 50 kD besitzt. Die Zusammensetzung besitzt in wäßriger Lösung mit einer 0.1%-igen Konzentration eine Viskosität von 4.7 mPa.s (siehe Seite 710, Tabelle 1). Die Alginat sind biokompatibel und können angewendet werden bei der Transplantationschirurgie.

Die vorliegende Anmeldung erfüllt nicht die Erfordernisse des Artikels 33(2) PCT, weil der Gegenstand der Ansprüche 15-27 nicht neu ist.

D3 offenbart eine mitogenfreie Substanz, die Mischpolymere von 10 bis 90 Molprozent Guluronsäure und aus jeweils auf 100% ergänzend Mannuronsäure aufweist und die ein Molekulargewicht von 10 bis 500 kD besitzen.

Als erstes ist das Gebiet der Transplantationschirurgie zu erwähnen, bei welchem mitogenfreie Substanzen dazu eingesetzt werden können, lebende Zellen einer Kapsel einzuschließen und die Auslösung immunologischer Reaktionen im Körper des Menschen implantieren zu können. Als besonders Beispiel wird die Einbringung von



insulinerzeugenden Zellen (Inseln) in die aus mitogenfreien Substanzen angegeben.  
Die vorliegende Anmeldung erfüllt nicht die Erfordernisse des Artikels 33(2) PCT, weil der Gegenstand der Ansprüche 15-27 nicht neu ist.

D4 offenbart ein gereinigten Alginat mit hohem Guluronsäure-Gehalt aus z.B. Laminaria oder Lesonia als Ausgangsmenge (siehe D5 : Seite 6, Zeilen 20-40 wo ein Molekulargewicht von 797 kD erwähnt wird). Die Alginat sind frei von phenolähnlichen Verbindungen und Endotoxin-frei. Die Alginatzusammensetzung wird verwendet zur Herstellung von Alginatkapseln für die Transplantationschirurgie.  
Die vorliegende Anmeldung erfüllt nicht die Erfordernisse des Artikels 33(2) PCT, weil der Gegenstand der Ansprüche 15-27 nicht neu ist.

**3) Erfinderische Tätigkeit (Art. 33(3) PCT) :**

Dokument 1, das als nächstliegender Stand der Technik angesehen wird, offenbart ein Verfahren, von dem sich der Gegenstand des Anspruchs 1 sich in dadurch unterscheidet, daß nach dem Sammeln und Entwässern des gefällten Alginats mindestens eine Wiederholung der Schritte erfolgt.

Die mit der vorliegenden Erfindung zu lösende Aufgabe kann somit darin gesehen werden, daß neue Verfahren zur Gewinnung hochgereinigter Alginat.

Die in Anspruch 1. der vorliegenden Anmeldung vorgeschlagene Lösung kann aus folgenden Gründen nicht als erfinderisch betrachtet werden (Artikel 33(3) PCT):

Aus D1 ist ein Verfahren bekannt bei dem eine Alginatlösung einer Behandlung mit einem Komplexbildner und einer Fällungsreaktion mit Äthanol ausgesetzt wird. Bei dem Extrahieren der Lösung wird Aktivkohle zugesetzt.

Eine Wiederholung von Schritten wird selbstverständlich zur ein mehr gereinigten Produkt.

D4 offenbart ein gereinigten Alginat mit hohem Guluronsäure-Gehalt aus z.B. Laminaria oder Lesonia als Ausgangsmenge (siehe D5 : Seite 6, Zeilen 20-40 wo ein Molekulargewicht von 797 kD erwähnt wird). Die Alginat sind frei von phenolähnlichen Verbindungen und Endotoxin-frei. Die Alginatzusammensetzung wird verwendet zur Herstellung von Alginatkapseln für die Transplantationschirurgie.

Die vorliegende Anmeldung erfüllt nicht die Erfordernisse des Artikels 33(3) PCT, weil der Gegenstand der Ansprüche im Hinblick aus dem gesamten technischen Lehre von D4 und D1 nicht auf einem erfinderischen Tätigkeit beruht.



**Zu Punkt VIII**

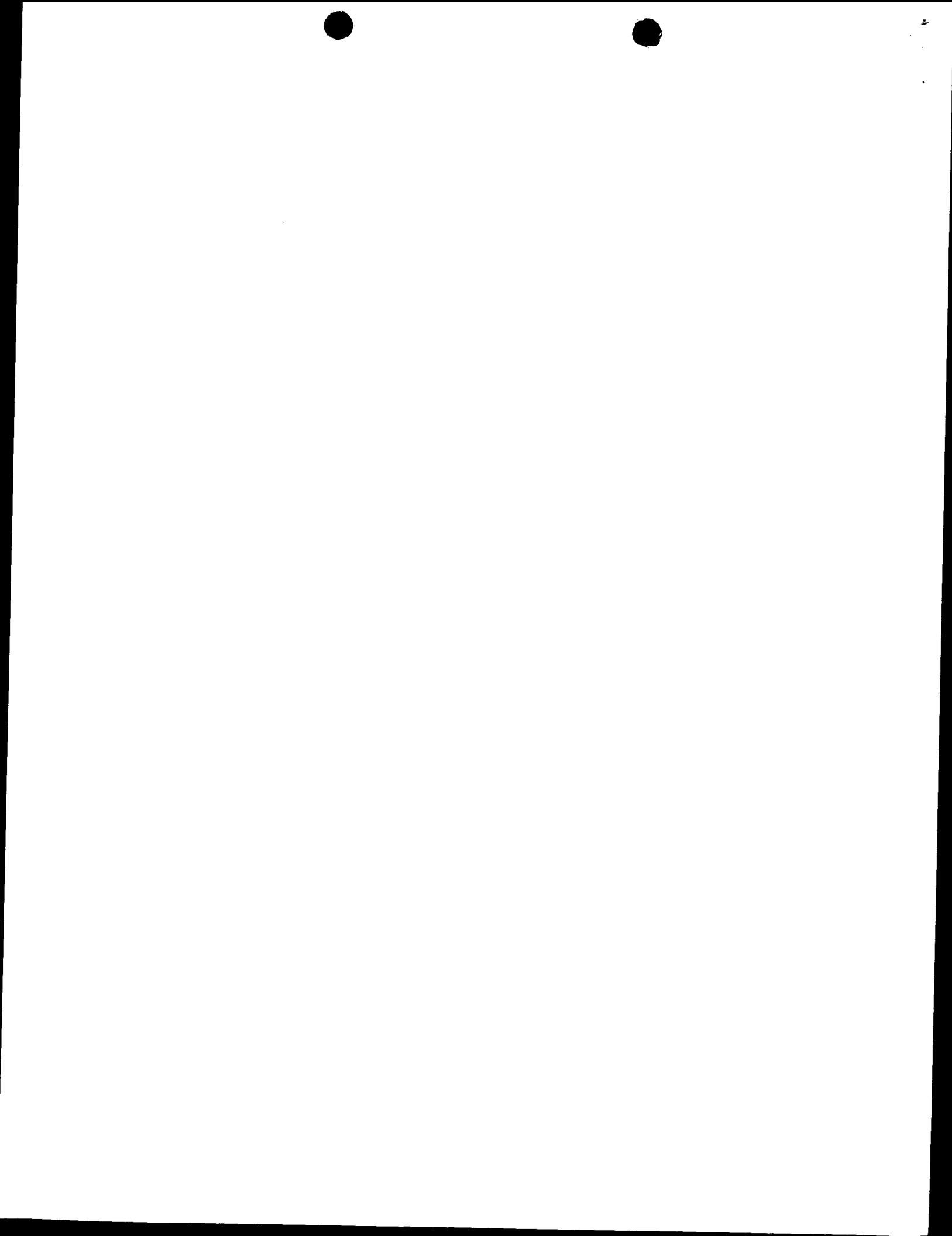
**Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung**

Aus der Beschreibung auf Seite 5 geht hervor, daß die folgenden Merkmale für die Definition der Erfindung wesentlich sind:

(1) die Herstellung geht aus von sauberem Algenfrishmaterial oder getrocknetem Algenmaterial.

(2) das Algenmaterial wird in Gegenwart Komplexbildern behandelt, woraus mit einem Bindemittel in Form eines Granulats oder einem porösen Material Zellbestandteile und Partikel sedimentiert werden.

Da der unabhängige Anspruch 1 diese Merkmale nicht enthält, entspricht er nicht dem Erfordernis des Artikels 6 PCT in Verbindung mit Regel 6.3 b) PCT, daß jeder unabhängige Anspruch alle technischen Merkmale enthalten muß, die für die Definition der Erfindung wesentlich sind.



Ein besonderes Problem stellt die Beschränkung auf relativ geringe Molekulargewichte dar. So ist beispielsweise aus "Immobilized Enzymes" von J. Chibata (A Halsted Press Book, John Wiley & Sons, 1978) bekannt, daß die Bio-Toxizität von Materialien mit der Zunahme des Molekulargewichts abnimmt.

Schließlich ist auch das oben genannte Verfahren nach P. de Vos et al. durch zahlreiche Verfahrensschritte, einschließlich einer Säurefällung, dem Einsatz toxischer Chemikalien (Chloroform), die Verwendung hochkonzentrierten Ethanol (rund 70%) und die Anwendung einer Zentrifugation, Elektrophorese oder Gefriertrocknung gekennzeichnet.

Aus WO-A-93/24077 sind ebenfalls Beschichtungsmaterialien aus Alginaten bekannt. Das hier vorgestellte Verfahren geht bereits von Alginaten aus, die im Handel erhältlich sind. Dieses Alginatpräparat wird mit einem Komplexbildner behandelt, um die zweiwertigen Metallionen zu entfernen. Die anschließende Behandlung mit Aktivkohle absorbiert die noch vorhandenen Polyphenole mit den damit verbundenen Proteinen und Fucoseeinheiten. Nach der Behandlung mit Aktivkohle wird das Alginat aus der Lösung gefällt, gewaschen und dann filtriert, um weitere Verunreinigungen zu entfernen. Das Molekulargewicht dieser Alginat ist eher im unteren Bereich anzusiedeln, es liegt im Bereich von etwa 2 bis 300 kD.

Mannuronsäure-reiche Alginat sind aus Biomaterials, Band 8, 1997, Seiten 707 bis 713 bekannt. Dieses Alginat wird aus Braunalgen extrahiert und anschließend gereinigt. Das Reinigungsverfahren basiert auf der Extraktion von mit  $Ba^{2+}$ -Ionen vernetzten Alginatperlen (hergestellt aus kohlebehandeltem Rohalginextrakt) mit schwachen Säuren, Citrat und Ethanol. Anschließend wird dann dialysiert, wonach dann das Alginat mit Ethanol gefällt wird.





4a

Ein weiterer Nachteil sämtlicher Reinigungsverfahren besteht in deren Beschränkung auf die Reinigung kommerziell verfügbarer Rohalginat. Die Verfahren sind nicht auf Frischmaterial oder geerntete Biomasse anwendbar. Außerdem sind die Verfahren aufgrund der umständlichen Verfahrensführung, des Energieaufwands und dem Einsatz toxischer Chemikalien für eine großtechnische Anwendung nicht praktikabel.

Die Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren zur Gewinnung hochgereinigter Alginat anzugeben, mit dem die Nachteile herkömmlicher Reinigungsverfahren vermieden werden und die Herstellung eines hochgereinigten Alginats, insbesondere in großtechnischem Maßstab, ermöglicht wird. Die Aufgabe der Erfindung ist es auch, ein neuartiges Alginat, insbesondere mit einem gegenüber den herkömmlichen Alginaten erhöhten Molekulargewicht, bzw. einer erhöhten Viskosität, anzugeben.

Diese Aufgabe wird durch ein Verfahren bzw. eine Alginatzusammensetzung mit den Merkmalen gemäß den Patentansprüchen 1 bzw. 16 gelöst. Vorteilhafte Ausführungsformen und Verwendungen der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.



PCT/EP99/05867

14720/PCT Dr/Vu

**NEUE PATENTANSPRÜCHE**

1. Verfahren zur Gewinnung einer hochgereinigten Alginatzusammensetzung, mit den Schritten:
  - a) Extrahieren von Algenmaterial in einer Lösung mit einem Komplexbildner,
  - b) Filtern der Lösung,
  - c) Ausfällen von Alginat aus der Lösung, und
  - d) Sammeln und Entwässern des gefällten Alginats, wonach die Schritte a) bis d) mindestens einmal wiederholt werden.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem zum Extrahieren als Komplexbildner Ethylendiamentetraessigsäure verwendet wird.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem das Extrahieren in einer Sodalösung erfolgt.
4. Verfahren gemäß Anspruch 2 oder 3, bei dem zum Extrahieren der Lösung Aktivkohle zugesetzt wird.
5. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem vor dem Filtern der Lösung ein Sedimentieren von Zellbestandteilen und Partikeln mit einem porösen Bindemittel aus der Lösung erfolgt.
6. Verfahren gemäß Anspruch 5, bei dem das Sedimentieren mit einem porösen Granulat auf der Basis von Kieselgur, Zellulose oder Recycling-Materialien aus nachwachsenden Rohstoffen erfolgt.



7. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem das Filtern mit Tiefenfiltern jeweils abnehmender Porengröße erfolgt.

8. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem das Ausfällen von Alginat mit Ethanol erfolgt.

9. Verfahren gemäß Anspruch 8, bei dem der Ethanolgehalt im Bereich von 10-50 % gewählt ist.

10. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem das Sammeln des ausgefällten Alginats durch Aufschäumen aus der Lösung, durch Dekantieren der Lösung oder durch Rühren der Lösung mit einer Rühr- und Sammeleinrichtung erfolgt.

11. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem das Entwässern des Alginats bei Raumtemperatur erfolgt.

12. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem als Algenmaterial in der Natur vorkommende Algenfrischmaterial oder in einem Bioreaktor bzw. Tankanlage kultiviertes Algenfrischmaterial oder Algenmaterial aus fusionierten oder regenerierten Algenzellen verwendet wird.

13. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem als Algenmaterial bestimmte Organ- oder Gewebeteile von Algen oder Algenteile bzw. bestimmte Organ- oder Gewebeteile von Algen oder Algenteilen aus bestimmten Stadien des Entwicklungszyklus von Algen verwendet werden.

14. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem als Algenmaterial Braunalgen oder andere alginatproduzierende Süßwasser- oder Salzwasseralgen verwendet werden.



15. Alginatzusammensetzung, die als Mischpolymer aus Mannuronsäure und Guluronsäure besteht, **dadurch gekennzeichnet**, daß im Mischpolymer ein Verhältnis von Mannuronsäure zu Guluronsäure im Bereich von 1% bis 90% gegeben ist und das mittlere Molekulargewicht des Mischpolymers größer als 350 kD ist.
16. Alginatzusammensetzung nach Anspruch 15, die in wässriger Lösung mit einer 0.1%-igen Konzentration eine Viskosität im Bereich von 10 bis 15 mPa · s besitzt.
17. Alginatzusammensetzung nach Anspruch 15, die in wässriger Lösung mit einer 0.5%-igen Konzentration eine Viskosität von 250 bis 300 mPa · s besitzt.
18. Alginatzusammensetzung nach Anspruch 15, die in wässriger Lösung bei Beleuchtung mit einer Anregungswellenlänge von 366 nm im Spektralbereich von 380 bis 550 nm keine Fluoreszenz-emission zeigt.
19. Alginatzusammensetzung nach Anspruch 15, die bei Farbtests mit der Folin-Denis-Reagenz oder mit Dimethoxybenzaldehyd keine Einfärbung zeigt.
20. Alginatzusammensetzung nach Anspruch 15, die in wässriger Lösung bei Beleuchtung mit einer Anregungswellenlänge von 270 nm im Spektralbereich von 300 bis 500 nm keine Fluoreszenz-emission zeigt.
21. Alginatzusammensetzung nach Anspruch 15, die keine mit dem photometrischen Proteinnachweis nach Bradford nachweisbaren Proteine enthält.





22. Alginatzusammensetzung nach Anspruch 15, die bei Implantation in die Nieren von BB/OK-Ratten keine signifikante immunologische Reaktion auslöst.

23. Alginatzusammensetzung nach Anspruch 15, die nach Anwendung des XTT/MTT-Tests, oder der Zellrotationsmethode, oder einer elektrischen Zellzahl- und Zellgrößenbestimmung zu keiner nachweisbaren Lymphozytenaktivierung führt.

24. Alginatzusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 15 bis 22, die nach einem der Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14 hergestellt ist.

25. Verwendung einer Alginatzusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 15 bis 24 zur Herstellung von Alginatkapseln oder -umhüllungen für die Transplantationschirurgie und für andere medizinische Anwendungen und für die Lebensmittelindustrie.

26. Verwendung einer Alginatzusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 15 bis 24 zur Herstellung von Alginatkapseln oder -umhüllungen für allogene und xenogene Gewebe.

27. Verwendung einer Alginatzusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 15 bis 24 zur Herstellung von Alginatkapseln oder -umhüllungen für Langerhans'sche Inseln, Nebenschilddrüsengewebe, endokrines Gewebe oder dopamin-sezernierende Zellen.

